

Spektroskopische Untersuchungen von Phenazinfarbstoffen im Hinblick auf ihre Anwendung in der histologischen Färbung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Alfred Heinrich Lange
aus Offenburg

1980

Spektroskopische Untersuchungen von Phenazinfarbstoffen im Hinblick auf ihre Anwendung in der histologischen Färbung

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau**

vorgelegt von

Alfred Heinrich Lange

aus Offenburg

1980

Dekan	Professor Dr. G. Wegner
Leiter der Arbeit:	Professor Dr. H. Baumgärtel
Referent:	Professor Dr. H. Baumgärtel
Korreferent:	Professor Dr. H.W. Zimmermann

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:

10. Juli 1980



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1976 bis März 1977 am Institut für Physikalische Chemie 1 der Universität Freiburg i. Br. unter Leitung von Herrn Professor Dr.H. Baumgärtel ausgeführt. Seit April 1977 wurde sie am Institut für Physikalische Chemie der Freien Universität Berlin weitergeführt.

Dem Institutsdirektor Professor Dr. H.W. Zimmermann danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Professor Dr. H. Baumgärtel sei besonders gedankt für die Themenstellung und seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herr Dr. P.M. Tavan hat die Arbeit mit der Durchführung der Rechnungen mit seinem Programm am Univac 1108 Computer der Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung mbH Göttingen in dankenswerter Weise sehr gefördert.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn T. Berthold und Herrn Dipl. Phys. D. Schröder für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Den Kollegen des Projekts "Biofarbstoffe" Herrn P. Minkus und Frau H. Romanat danke ich für die gute Zusammenarbeit. Frau A. Naujok und Frau U. Zimmermann danke ich für die Experimente zur biologischen Färbung.

An dieser Stelle sei auch allen Freunden und Kollegen der Arbeitskreise in Freiburg und Berlin gedankt, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Zeit mit ihnen war abwechslungs- und lehrreich.

Dem Rechenzentrum der Universität Freiburg danke
ich für die Gewährung von Rechenzeit.

Frau Brigitte Greiner, Giengen a.d. Brenz, danke
ich für die Durchsicht des Manuskripts und vieles mehr.

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	METHODISCHE GRUNDLAGEN	2
2.1	Elektronenspektren von Molekülen	2
2.2	Polarisation der Elektronenübergänge - die Polarisationsspektroskopie	5
2.3	Semiempirische Modellrechnungen	7
2.3.1	Der π -Elektronen Hamiltonoperator	7
2.3.2	Gruppentheoretische Klassifizierung von Vielelektronen-Wellenfunktionen	9
2.3.3	PPP-CI-Beschreibung angeregter π -Elektronensysteme	9
3.	DIE ELEKTRONENSPEKTREN DER AMINOPHENAZINE UND IHRE DEUTUNG	13
3.1	Der Einfluß der Doppelanregung auf die berechneten Spektren des Phenazins und seiner Aminoderivate	13
3.1.1	Die Anordnung der beiden untersten an- geregten π - π^* Singulett Zustände	14
3.1.2	Die Lage der übrigen tiefliegenden an- geregten π - π^* Singulett Zustände	18
3.2	Die experimentellen Elektronenspektren bei 77 K; Absorptions-, Fluoreszenz- und Polarisationsgrad-Spektren	23
3.3	Der Einfluß der Aminofunktion auf das Elektronenspektrum (Absorption)	32
3.4	Vergleich der Ergebnisse der Modellrechnungen mit den experimentellen Spektren	35
3.4.1	Der Spektralbereich zwischen 20000 cm^{-1} - 30000 cm^{-1}	35
3.4.2	Der spektrale Bereich zwischen 30000 cm^{-1} und 40000 cm^{-1}	37
3.5	Lösungsmittelabhängigkeit der Absorptions- spektren der Aminophenazine bei 25°C	42

4.	EINIGE EIGENSCHAFTEN IM GRUNDZUSTAND	44
4.1	Die pK_s -Werte	44
4.1.1	Methodische Grundlagen	44
4.1.2	Experimentelle Ergebnisse und ihre Deutung	50
4.1.2.1	Basizität und Konformation	50
4.1.2.2	Stellung des Protons bei den Kationensäuren	51
4.2	Die 1H -NMR-Spektren der Aminophenazine	54
4.2.1	Beschreibung der Systeme erster Ordnung	55
4.2.2	Beschreibung der AA'BB'-Systeme	55
4.2.3	Beschreibung der ABCD-Systeme	56
4.3	Korrelation der 1H -NMR-Daten mit den pK_s -Werten der Verbindungen <u>6</u> , <u>7</u> und <u>8</u>	63
4.4	Berechnete π -Elektronendichten und π -Bindungsordnungen	65
4.5	Vergleich der 1H -NMR-Daten mit den errechneten π -Elektronendichten	70
5.	EINSATZ DER FARBSTOFFE IN DER HISTOLOGISCHEN FÄRBUNG	73
5.1	Wichtige Gesichtspunkte der Färbung	73
5.2	Ergebnisse der Färbung	74
5.3	Diskussion der Ergebnisse	77
6.	EXPERIMENTELLER TEIL	80
6.1	Verwendete Geräte und Lösungsmittel	80
6.2	Darstellung und Charakterisierung der Aminophenazine	83
6.3	Die Infrarotspektren der Aminophenazine <u>1</u> - <u>8</u>	91
6.4	Die Massenspektren der Aminophenazine <u>1</u> - <u>10</u>	94
6.5	Die Elektronenspektren der Aminophenazine <u>1</u> - <u>8</u> und <u>10</u> bei 77 K	95
7.	ZUSAMMENFASSUNG	106
8.	LITERATURVERZEICHNIS	108

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Verwendung von Neutralrot, als Farbstoff zur Vitalfärbung von Zellen, ist seit längerem bekannt /1,2/. Da die Färbung von biologischem Material in vielerlei Hinsicht von größter Bedeutung ist, war es naheliegend, andere Abkömmlinge des Phenazins für diesen Zweck zu synthetisieren. Bei der Färbung von biologischem Material liegt eine Wechselwirkung von Farbstoff mit Biopolymeren vor, die sehr komplexer Natur ist /3/. Im Hinblick auf die Kernfärbung /4/, an die im Rahmen dieser Arbeit vor allem gedacht ist, spielen Coulombwechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindung und Intercalation eine wichtige Rolle.

Um ein optimales Färbeergebnis zu erzielen, muß die Struktur des Farbstoffs durch Wahl von Zahl, Ort und Art der Substituenten beeinflußt werden. Die Beschreibung der in diesem Zusammenhang interessierenden Strukturmerkmale umfaßt besonders die Elektronenstruktur der Moleküle im Grund- und Anregungszustand. Hieraus folgt die Lage der Elektronenbanden und die Protonenaffinität. Ferner können sterische Verhältnisse von Interesse sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Aminophenazine untersucht werden, da sich diese eng an das eingangs erwähnte Neutralrot anschließen. Die spektroskopischen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse wurden bisher nicht systematisch untersucht. Auch über die Protonenaffinität dieser Farbstoffe liegen nur vereinzelt Meßdaten vor. Es scheint wünschenswert, aus diesen Eigenschaften der Moleküle und den Ergebnissen quantenmechanischer Näherungsrechnungen, eine Arbeitshypothese für die histologische Färbung zu gewinnen.

2. METHODISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Elektronenspektren von Molekülen

Atome und Moleküle können durch elektromagnetische Strahlung Energie aufnehmen. Ursache ist die Wechselwirkung zwischen der elektrischen oder der magnetischen Komponente des Lichts mit den Atomen oder Molekülen. Da die Wechselwirkung mit der elektrischen Komponente jedoch im allgemeinen um den Faktor 10^5 stärker ist als die mit der magnetischen Komponente, beobachtet man Übergänge, die auf den erstgenannten Prozeß zurückzuführen sind viel häufiger. Emissionsprozesse sind gewöhnlich in ähnlicher Weise mit der elektrischen Komponente der Strahlung verknüpft. Eine erlaubte ($\epsilon \geq 10^4$) Anregung eines Moleküls durch Licht ist nur möglich, wenn die Energiedifferenz zwischen angeregtem Zustand und Grundzustand $E_a - E_g = \Delta E = h\nu$ ist (ν ist die Frequenz des eingestrahltten Lichts), und der Elektronenübergang mit einer Änderung der Ladungsverteilung verbunden ist, die zu einem elektrischen Dipol (Übergangsmoment $\bar{P}$) führt. Eine qualitative Aussage, ob diese Bedingungen erfüllt sind, ermöglicht die Gruppentheorie: Das direkte Produkt der irreduziblen Darstellungen beider an der Anregung beteiligten Orbitale muß die Darstellung einer Komponente der Translation (T_x, T_y, T_z) enthalten /5/.

Elektronenspektren organischer Moleküle werden häufig in Lösung vermessen. Das bedeutet aber, daß Rotationen nicht mehr aufgelöst werden können. Man beobachtet Elektronenübergänge, die mit Schwingungsübergängen gekoppelt sind (Bandenspektren). Bei tiefen Temperaturen (77K) können Elektronenschwingungsspektren in glasartigen Matrizen gemessen werden, dabei erfolgt die Anregung bevorzugt aus dem untersten Schwingungszustand.

In vorliegender Arbeit werden heteroaromatische Systeme untersucht, die im UV-Bereich gemessen werden können. In diesem Bereich wird bevorzugt das π -Elektronensystem angeregt. Die π - π^* Übergänge überdecken meist die intensitäts-schwächeren n - π^* Übergänge (ϵ bis 10^3).

Da die Moleküle mit ihrer Umgebung im energetischen Gleichgewicht stehen, wird die Energie der angeregten Zustände wieder abgeführt, sei es durch strahlungslose Desaktivierung (z.B. durch Übertragung der Energie auf Nachbarmoleküle) oder als Licht. Im letzteren Fall beobachtet man Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz. Bei der Fluoreszenz erfolgt die Emission der Strahlung meist (eine Ausnahme bildet z.B. Azulen und einige seiner Derivate/6/) aus dem untersten Schwingungszustand des ersten angeregten Singulettzustandes S_1 . Höher angeregte Zustände relaxieren strahlungslos in diesen ersten angeregten Zustand S_1 . Aus oben genannten Gründen erscheint die Fluoreszenz gegenüber der Absorption spiegelbildlich und langwellig verschoben. Ist die Lebensdauer des S_1 -Zustandes (meist 10^{-9} - 10^{-8} sec) länger als die Relaxation der Moleküle der Umgebung (die durchschnittliche Relaxationszeit für die Dipolorientierung liegt bei 10^{-12} - 10^{-10} sec /7/), so resultiert eine energetische Veränderung dieses Zustandes. Dadurch wird die Lage der Fluoreszenzbande zusätzlich verschoben.

Neben der Fluoreszenz beobachtet man manchmal auch Phosphoreszenz. Sie hat längere Abklingzeiten als die Fluoreszenz und erscheint längerwellig. Hier erfolgt die Emission der Strahlung aus dem ersten angeregten Triplettzustand, der energetisch etwas tiefer liegt als der S_1 -Zustand. Bei Übergängen zwischen Triplett- und Singulett-system muß die Multiplizität des Systems geändert werden. Diese Änderung erfolgt durch Umlappen des Elektronenspins. Dieser Vorgang ist bei reinen Elektronenübergängen verboten.

Durch Spin-Bahn Kopplung, die von der Ordnungszahl der betreffenden Atome abhängt, erfolgt eine Lockerung dieses Übergangsverbots. Für leichte Atome gilt das Übergangsverbot noch so streng, daß relativ lange Lebensdauern für die Multipllettzustände resultieren. Sie liegen für Triplettzustände organischer Moleküle im Bereich von 10^{-3} - 10^2 sec. Die angeregten Singulettzustände (Fluoreszenz) zeigen dagegen eine durchschnittliche Lebensdauer von 10^{-10} - 10^{-6} sec.

Abb. 1 zeigt das Termschema eines Systems (Jablonski-Diagramm /8/) mit Singulett-Grundzustand. Es zeigt die Lage der unteren Singulett und Triplettzustände, sowie einiger vibronischer Niveaus. Zusätzlich sind die wichtigsten Übergänge zwischen den Niveaus eingezeichnet.

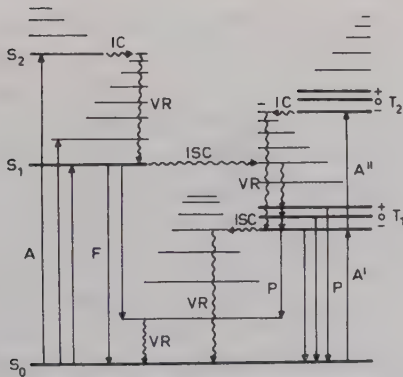


ABBILDUNG 1

S_i : Singulettzustände,
 T_i : Triplettzustände
 mit den Nullfeldniveaus
 $+, 0, -$ (übertrieben ge-
 zeichnet),

A: Absorption,

A' : spinverbotene Singulett-Triplett-Absorption,

A'' : Triplett-Triplett-Absorption,

IC: Innere Umkehr,

VR: vibronische Relaxation, ISC: Intersystem Crossing,

F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz. Elektronenzustände sind dick, Schwingungszustände sind dünn gezeichnet.

2.2 Polarisation der Elektronenübergänge - die Polarisationsspektroskopie

Bei Elektronenspektren hat man elektrische Dipolübergänge vorliegen, denen ein definiertes Übergangsmoment P zugeordnet werden kann. Licht kann nur absorbiert werden, wenn zumindest eine Komponente des Übergangsmoments (p_x, p_y, p_z) und des elektrischen Feldvektors E gleichgerichtet sind. Die selben Verhältnisse beobachtet man auch bei Strahlungsemission; d.h. der Feldvektor des Lichts und das Übergangsmoment sind parallel.

Wird nach höheren Zuständen angeregt, erfolgt die Emission zumeist aus dem ersten angeregten Zustand. Das bedeutet, daß in diesem Fall Absorptions- und Emissionsoszillator unter einem bestimmten Winkel gegeneinander orientiert sind.

In glasartig erstarrten Lösungen kann sich die Lage der Moleküle während der Absorption und Emission nicht ändern. Strahlt man in diese Lösungen linear polarisiertes Licht ein, so können nur Moleküle angeregt werden, die eine geeignete Orientierung haben. Diese ausgewählten angeregten Moleküle emittieren aus dem ersten angeregten Zustand. Mißt man den Winkel zwischen Emissions- und Absorptionsoszillator, so kann eine Aussage über die relative Orientierung von Emissions- und Absorptionsoszillator gemacht werden /9/.

Der Polarisationsgrad der Lumineszenz ist durch die Beziehung

$$p = \frac{I_p - I_s}{I_p + I_s}$$

gegeben. I_p und I_s entsprechen den Intensitäten des emittierten Lichts, das senkrecht bzw. parallel zur Richtung des Erregerlichts polarisiert ist. Bei Molekülen mit höchstens zwei-

zähliger Symmetrie kann P Werte zwischen + 0,5 und - 0,33 annehmen. Das ist der Fall, wenn Absorptions- und Emissionsoszillator parallel bzw. senkrecht aufeinander stehen. Bei Winkeln zwischen 0 und 90 Grad nimmt der Polarisationsgrad Zwischenwerte an, die sich nach der Gleichung

$$P = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{\cos^2 \alpha + 3}$$

berechnen, wobei α der Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsoszillator ist /10,11/. Die theoretischen Werte von P werden infolge Bandenüberlagerungen und Depolarisationsmechanismen nur selten beobachtet. Deshalb wird im Folgenden, zur Analyse der Elektronenspektren, lediglich der qualitative Verlauf der Anisotropiespektren berücksichtigt.

Liegt in einem beobachteten System Lumineszenz vor, so kann man folgende Arten von Polarisationsgradspektren aufnehmen: Das Absorptionspolarisationsgradspektrum bezogen auf die Fluoreszenz (APF). Bei dieser Methode wird die Erregerwellenlänge variiert und der Empfänger fest auf eine Wellenlänge im Bereich der Fluoreszenz eingestellt. Die Aufnahme des Absorptionspolarisationsgradspektrums, bezogen auf die Phosphoreszenz (APPh), schließt sich eng an die Technik an, die bei der APF-Spektroskopie verwendet wird.

Beim Fluoreszenzpolarisationsgradspektrum (FP) wird in eine intensive Bande des Absorptionsspektrums eingestrahlt und die relative Polarisation der Banden des Fluoreszenzspektrums bestimmt. Analog verfährt man bei den Phosphoreszenzpolarisationsgradspektren (PhP).

2.3 Semiempirische Modellrechnung

Bei der Wahl des Rechenverfahrens war die Größe der Moleküle und die Fragestellung nach den spektroskopischen Eigenschaften der Aminophenazine entscheidend. Da es sich bei den Aminophenazinen um Verbindungen mit großen konjugierten π -Systemen handelt, wurde ein semiempirisches Modell nach Pariser-Parr und Pople (PPP) /19/ benutzt. Auf die PPP-Methode soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich beschrieben wird. Eine besonders umfassende Darstellung liefern Pople und Beveridge /12/.

2.3.1 Der π -Elektronen Hamiltonoperator

Für den PPP-Hamiltonoperator wurde die folgende Darstellung verwendet (Energien sind in eV, Abstände in Å angegeben) /13/.

$$\begin{aligned}
 H = & \sum_{n < m} Z_n Z_m R_{nm} + \sum_{m, \sigma} (-I_m - \sum_{n \neq m} Z_n R_{mn}) c_{m\sigma}^+ c_{m\sigma} \\
 & + \sum_{\substack{n, m, \sigma \\ n \neq m}} t_{nm} c_{n\sigma}^+ c_{m\sigma} + 1/2 \sum_{\substack{n, m \\ \sigma, \sigma'}} R_{nm} c_{n\sigma}^+ c_{n\sigma} c_{m\sigma'}^+ c_{m\sigma'} \quad (1)
 \end{aligned}$$

Dabei beschreibt der erste Term die Kernabstoßung, der zweite die Anziehung zwischen Elektronen und Kernen, der dritte die Elektronendelokalisierung und der letzte Term die wechselseitige Abstoßung der Elektronen. $c_{m\sigma}^+$ ($c_{m\sigma}$) sind Fermion-Erzeugungs(Vernichtungs)-Operatoren, die die π -Elektronen in einem orthonormalen Satz von atomaren Spinorbitalen positionieren. R_{mn} sind die effektiven Coulombintegrale zwischen den Orbitalen an den Atomen n und m . Sie sind gegeben durch die Beziehung (Ohno-Formel) /14/:

$$R_{nm} = 14,397 \{ [2 \times 14,397 / (R_{nn} + R_{mm})]^2 + r_{nm} \}^{-1/2} \quad (2)$$

wobei r_{nm} der Abstand zwischen den Zentren n und m ist. Z_n ist die Ladung des Molekülrumpfes, I_n das effektive Ionisierungspotential eines π -Elektrons am isolierten Atom n und t_{nm} bezeichnet das Resonanzintegral zwischen den Zentren n und m .

$$t_{nm} = \begin{cases} 0, & \text{wenn } n \text{ und } m \text{ nicht benachbart sind} \\ -2,6 + 3,21 (r_{nm} - 1,397) & \text{sonst} \end{cases} \quad (3)$$

Die Summe im letzten Term von Gl. 1 erstreckt sich nur über Summanden, für die gilt: $(n, \sigma) \neq (m, \sigma')$. Die für die empirischen Parameter Z_n , I_n und R_{nn} verwendeten Werte sind in Tabelle 1 zusammengestellt /15/.

Tabelle 1

Atom		Z_n	I_n/eV	R_{nn}/eV
C-C	C	1,00	11,16	11,13
C-N	C	1,04	11,61	11,35
Amino-	N	1,96	27,42	16,28
Pyridin-	N	0,92	13,03	11,88

Für alle Bindungswinkel in den aminosubstituierten Phenazinen wurden Werte von 120° angenommen. Für die C-C und C-N Bindungslängen wurden 1,397 Å bzw. 1,3 Å eingesetzt. Es zeigte sich, daß die berechneten Energieniveaus gegenüber kleinen Änderungen der Bindungslängen äußerst unempfindlich sind.

2.3.2 Gruppentheoretische Klassifizierung von Vielelektronen-Wellenfunktionen

Jedes Molekülorbital ψ_n ist durch Anzahl und Lage seiner Knotenflächen charakterisiert. Es verhält sich gegenüber Symmetrieeoperationen in charakteristischer Weise und kann entsprechend seines symmetrischen und antisymmetrischen Verhaltens (bei nichtentarteten Punktgruppen) gegenüber allen Elementen der Gruppe klassifiziert werden, d.h. es spannt eine irreduzible Darstellung der molekularen Symmetriegruppe des Moleküls auf. Im Falle des Phenazins, das der D_{2h} -Punktgruppe angehört, transformieren sich die π -MO's entsprechend der irreduziblen Darstellungen B_{2g} , B_{3g} , A_u und B_{1u} , wenn das Molekül in die x-y Ebene gelegt wird. Die 14-Elektronenzustände gehören dann zu den irreduziblen Darstellungen A_g , B_{1g} , B_{2u} und B_{3u} . Entsprechend kann man die elektronischen Zustände des 3,7-Diaminophenazins und des 2,3-Diaminophenazins nach den irreduziblen Darstellungen der C_{2v} -Punktgruppe klassifizieren (A_1 und B_2 bzw. A_1 und B_1) /5/.

2.3.3. PPP-CI-Beschreibung angeregter π -Elektronensysteme

Für eine vollständige und qualitativ korrekte Beschreibung der niederenergetischen Anregungen konjugierter π -Elektronensysteme ist die Aufnahme aller gegenüber dem Selfconsistent-Field (SCF) Grundzustand ein- und zweifach angeregter Konfigurationen in die Konfigurations-Wechselwirkungs (CI) Basis (D-CI) angebracht. Dies hat eine Vielzahl von Untersuchungen in den letzten Jahren gezeigt (vgl. Ref. 13, 16 -18 und die dort zitierten Arbeiten).

Zwar liefern bei entsprechender Parametrisierung auch herkömmliche PPP-CI-Rechnungen, bei denen nur die einfach angeregten Konfigurationen berücksichtigt werden (S-CI) /19,20/, für einen Teil der angeregten π - π^* -Übergänge akzeptable Anregungsenergien und Übergangsdipolmomente; es gibt jedoch in allen konjugierten Molekülen eine Reihe von Zuständen, bei denen dies nicht der Fall ist. Ein markantes Beispiel für die letztere Klasse von Zuständen ist der niedrigliegende 2^1A_g -Zustand der Polyene /21,18a/, während zur ersteren Klasse z.B. diejenigen Zustände zu rechnen sind, die zu den drei Hauptbanden der Polyacene (1^1L_b , 1^1L_a , 1^1B_b in der Platt'schen /22,23/ α , p , β in der Clar'schen bzw. 1^1B_{3u} , 1^1B_{2u} , 2^1B_{3u} in gruppentheoretischer Notation) Anlaß geben. Um die Bedeutung der Doppelanregung für eine vollständige Beschreibung der π - π^* -Übergänge von Phenazin aufzuzeigen, werden in Abb. 2 die Ergebnisse von D-CI-Rechnungen mit S-CI-Rechnungen verglichen. Dabei wurden die S-CI-Zustände in die beiden oben erwähnten Klassen gruppiert. Die A_g -Zustände und der 3^1B_{3u} -Zustand werden nur durch D-CI-Rechnung richtig wiedergegeben (vgl. linkes S-CI-Energieniveau-Schema). Abbildung 2 zeigt, daß die Hinzunahme der Doppelanregung diese Zustände gegenüber den übrigen Zuständen energetisch stark senkt, was zu einer veränderten Anordnung im D-CI-Spektrum führt.

Mit der D-CI-Methode berechnet man zu große Anregungsenergien, weil die Energie des Grundzustands im Vergleich zu Ergebnissen der SCF-Rechnung stark abgesenkt resultiert. Zur Korrektur dieses Fehlers müssen noch drei- und vierfach angeregte Konfigurationen berücksichtigt werden, die alle angeregten Zustände näherungsweise um den gleichen Energiebetrag gegenüber dem Grundzustand absenken /18,24/. Diese Energie stammt aus der

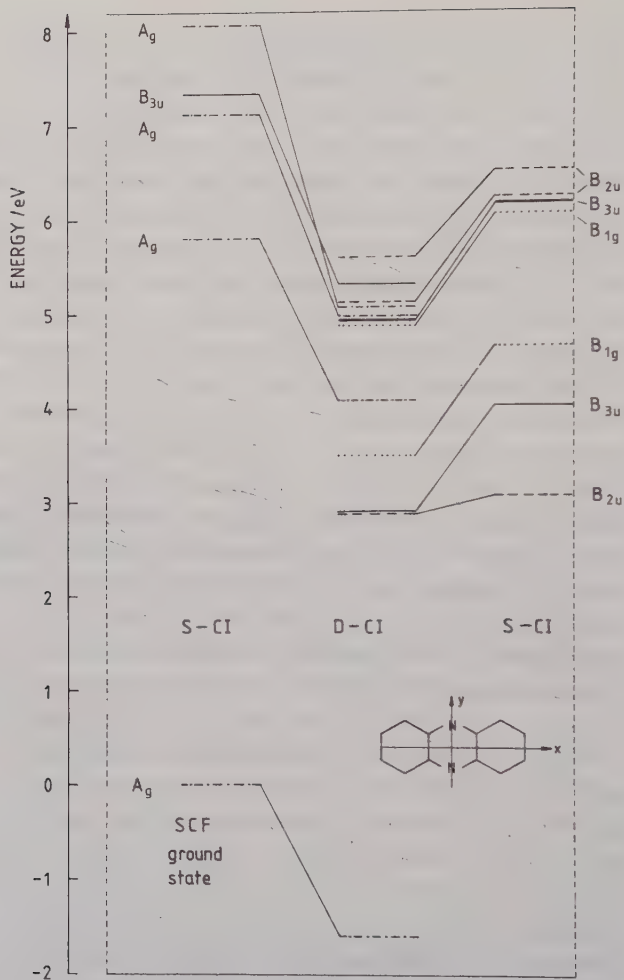


ABBILDUNG 2

Vergleich der Energien der Zustände des π -Elektronensystems von Phenazin, erhalten aus CI-Rechnungen, bei denen alle Einfachanregungen des SCF-Zustandes (S-CI) bzw. alle Ein- und Zweifachanregungen berücksichtigt (D-CI) werden.

grundzustandsartigen Korrelation derjenigen Elektronen, die an den virtuellen Anregungen nicht beteiligt sind. Eine Abschätzung der Anregungsenergien, die diesen Effekt in Rechnung stellt, ist durch den folgenden einfachen Ausdruck gegeben /25/

$$\Delta E = E_D - (n/N)E_{0,D} \quad (4)$$

wobei E_D die CI-Energie (Energie bezogen auf den SCF-Grundzustand) aus einer D-CI-Rechnung ist. $E_{0,D}$ ist die entsprechende Grundzustandsenergie und N die Anzahl der π -Elektronenpaare des konjugierten π -Systems. n bezeichnet die Anzahl der korrelierten Elektronenpaare, die durch die elektronische Anregung auseinandergerissen oder gestört werden. Eine geeignete Wahl ist $n = 1,5$.

Es wurden alle in dieser Arbeit berechneten D-CI-Anregungsenergien mit Hilfe von Gleichung 4 korrigiert und auf diese Weise der Einfluß von drei- und vierfach angeregten Spektren abgeschätzt. Solche Konfigurationen wurden wegen der großen Ausdehnung der untersuchten π -Elektronensysteme nicht berücksichtigt. (Schon ohne diese Konfigurationen mußten z.B. bei der D-CI-Berechnung der angeregten π - π^* Singulett-Zustände des 2-Aminophenazins 1653 spinadaptierte Konfigurationen in die CI-Basis aufgenommen werden).

3. DIE ELEKTRONENSPEKTREN DER AMINOPHENAZINE UND IHRE DEUTUNG

3.1 Der Einfluß der Doppelanregung auf die berechneten Spektren des Phenazins und seiner Aminoderivate

In Abbildung 3 und Abbildung 4 sind die mit CI-Rechnungen berechneten π - π^* Übergänge des Phenazins und einiger seiner Aminoderivate (Typ 1 , 3 und 6, vgl. Seite 15 + 16) dargestellt. Die der herkömmlichen PPP-Methode entsprechende S-CI-Behandlung (siehe Abb. 3) liefert für diese Moleküle als niedrigste Anregung einen Zustand, der durch die Beförderung eines Elektrons aus dem höchsten besetzten Molekülorbital in das unterste unbesetzte Molekülorbital charakterisiert ist. Dieser Übergang ist in der kurzen Molekülachse polarisiert und entspricht dem 1L_a -Zustand des Platt'schen Perimeter-Modells /22/. Die dem 1L_b -Zustand entsprechende, in der langen Achse polarisierte Anregung wird nach diesen Rechnungen bei geringfügig höheren Energien erwartet. Im Phenazin werden unterhalb des stark erlaubten, dem 1B_b -Zustand entsprechenden $2{}^1B_{3u}$ -Zustands noch drei weitere, für Ein-Photon-Dipolübergänge verbotene Zustände (${}^1B_{1g}$, $2{}^1A_g$, $2{}^1B_{1g}$), vorhergesagt. Durch Aminosubstitution, die die D_{2h} -Symmetrie bricht, werden diese Zustände schwach erlaubt.

Die Berücksichtigung der Elektronenkorrelation durch die Hinzunahme aller zweifach angeregten Konfigurationen zur CI-Basis verändert beim Phenazin die relative Lage der erwähnten angeregten Zustände nur wenig:

1.) Der Abstand der beiden niedrigsten Anregungen ${}^1B_{2u}$ und ${}^1B_{3u}$ wird um etwa 0,3 eV verringert, so daß diese Zustände als fast entartet vorhergesagt werden (vgl. Abb.4),

2.) der 2^1A_g -Zustand wird relativ zu den übrigen Zuständen um etwa 0,5 eV rotverschoben, 3.) oberhalb des 2^1B_{3u} -Zustands wird durch die D-CI-Rechnung eine gegenüber den S-CI-Resultaten vergrößerte Zustandsdichte* vorhergesagt.

Drastische qualitative Unterschiede weisen jedoch die S-CI- und die D-CI-Beschreibung des Einflusses von Aminogruppen auf die relative Lage der angeregten Zustände auf. Offensichtlich sind hierfür Korrelationseffekte von entscheidender Bedeutung. Diese Unterschiede sollen nun im einzelnen diskutiert werden.

3.1.1 Die Anordnung der beiden untersten angeregten π - π^* Singulett Zustände.

In der S-CI-Näherung werden die beiden niedrigsten angeregten Zustände $^1B_{2u}$ und $^1B_{3u}$ vom Phenazin, beim Übergang zum einfach aminosubstituierten Molekültyp 1, durch die Vergrößerung des π -Elektronensystems, sowie die Brechung der D_{2h} -Symmetrie um 0,18 eV bzw. 0,12 eV rotverschoben. Somit wächst der energetische Abstand dieser Zustände nur unwesentlich. Bei Aufnahme der Doppelanregung in die CI-Basis ergibt sich demgegenüber ein vollständig verändertes Bild. Nun bewirkt die Aminosubstitution eine Rotverschiebung des $^1B_{2u}$ -Zustands um 0,52 eV, während sie die Lage des $^1B_{3u}$ -Zustands fast überhaupt nicht (0,02 eV) verändert. D.h. diese beiden Zustände, die im Phenazin fast entartet sind, sind in 1 soweit auseinander gerückt, daß sie im UV-Spektrum als getrennte Banden beobachtet werden sollten.

Die Addition einer weiteren Aminogruppe in 3- bzw. 7-Stellung ändert in der S-CI-Näherung die Anregungsenergie des $^1B_{2u}$ -Zustands fast überhaupt nicht, während

* Anzahl der Übergänge pro Energieintervall.

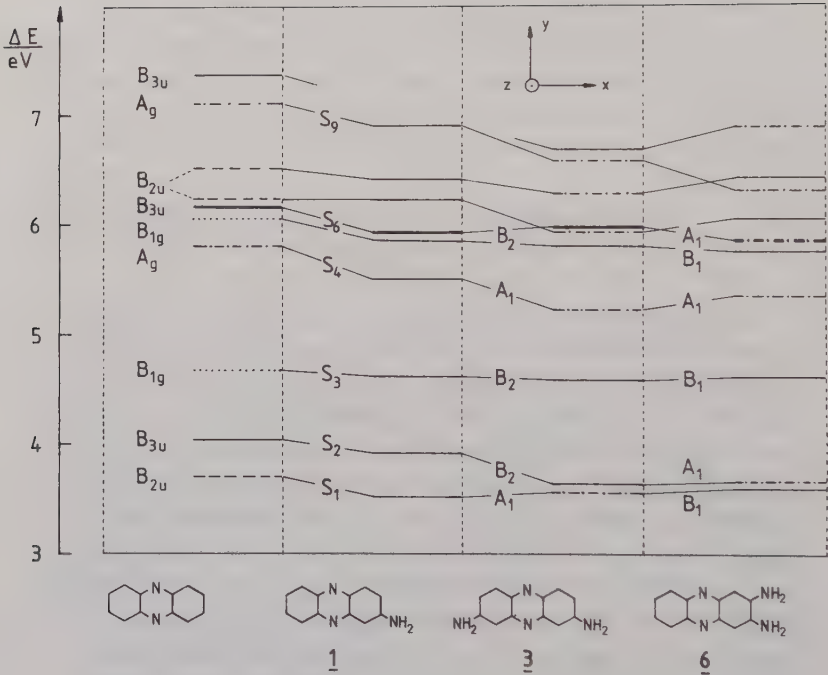


ABBILDUNG 3

Vergleich der PPP-S-CI-Anregungsenergien des Phenazins und der Verbindungen 1, 3 und 6.

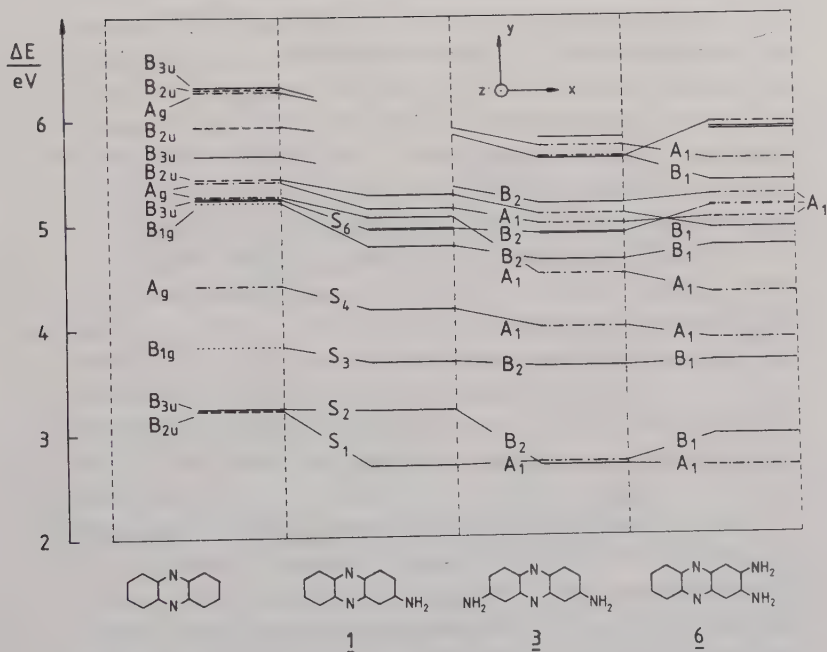


ABBILDUNG 4

Vergleich der PPP-D-CI-Anregungsenergien des Phenazins und der Verbindungen 1, 3 und 6.

Die Anregungsenergien wurden jeweils mit Gleichung 4 korrigiert.

sie jene des 1^1B_{3u} -Zustands um etwa 0,37 eV verringert, so daß diese Zustände in 3 und 6 als fast entartet vorhergesagt werden. Ihre Anregungsenergie entspricht dabei in etwa jener des untersten angeregten Singulettzustands vom Phenazin und 2-Aminophenazin 1.

Die Berücksichtigung von Korrelationseffekten durch zweifach angeregte Konfigurationen führt auch für die zweifache Aminosubstitution zu einer veränderten Beschreibung ihres Einflusses auf die Lage der beiden untersten angeregten Zustände. Der 1^1B_{3u} -Zustand wird gegenüber Phenazin und 2-Aminophenazin 1 um fast 0,6 eV bathochrom verschoben und erscheint bei 3 und 6 als unterste Anregung. Je nach Position der zweiten Aminogruppe wird zwar auch die Anregungsenergie des 1^1B_{2u} -Zustands gegenüber Phenazin mäßig (6) bzw. stark (3) verkleinert; wie oben erwähnt, wird dieser Zustand jedoch schon durch einfache Aminosubstitution (1) stark rotverschoben, so daß seine Lage durch die zweite Aminosubstitution eher gegenteilig beeinflußt wird.

Die D-CI-Beschreibung des Einflusses von Aminogruppen auf die beiden nahe beieinanderliegenden untersten angeregten Singulettzustände des Phenazins kann daher qualitativ wie folgt zusammengefaßt werden: Die erste Aminosubstitution verschiebt nur den 1^1B_{2u} -Zustand, die Zweite auch den 1^1B_{3u} -Zustand um ein halbes eV (3) ins Rote. Im Gegensatz dazu sagen die S-CI-Rechnungen fast keine Verschiebung der ersten Bande des UV-Spektrums voraus.

3.1.2 Die Lage der übrigen tiefliegenden angeregten π - π^* -Singulett Zustände

Im spektralen Bereich unterhalb des stark erlaubten 1B_b -Zustands (dieser Zustand ist in den Abb. 3 und 4 durch doppelte Linienstärke hervorgehoben) führt die Berücksichtigung von Doppelanregung bei den Verbindungstypen 3 und 6 zum Auftauchen eines 4^1A_1 -Zustands, der sich vom 3^1A_g -Zustand des Phenazins herleitet. Ganz wie schon beim Phenazin beobachtet (siehe Oben), wird daneben der dem 2^1A_g -Zustand entsprechende 3^1A_1 -Zustand von 3 und 6 lanwellig verschoben. Ebenso (analog zum Phenazin) nimmt auch bei den Aminoderivaten 1, 3 und 6 die Zustandsdichte im Energiebereich des 1B_b -Zustands zu.

In Tabelle 2 - 5 sind die Anregungsenergien und Oszillatorstärken des Phenazins, 2-Aminophenazins (1), 3,7-Diaminophenazins (3) und 2,3-Daminophenazins (6) zusammengestellt. Die PPP-D-CI-Anregungsenergien wurden jeweils mit Gleichung 4 korrigiert.

Symmetrie	E_{S-CI}/eV	f_x	f_y	E_{D-CI}/eV	f_x	f_y
1^1B_{2u}	3,709	-	0,85	3,214	-	0,79
1^1B_{3u}	4,039	0,96	-	3,235	0,83	-
1^1B_{1g}	4,669	-	-	3,841	-	-
2^1A_g	5,810	-	-	4,428	-	-
2^1B_{1g}	6,057	-	-	5,226	-	-
2^1B_{3u}	6,116	2,27	-	5,272	1,77	-
3^1A_g	7,115	-	-	5,287	-	-
4^1A_g	8,053	-	-	5,418	-	-
2^1B_{2u}	6,243	-	0,24	5,465	-	0,02
3^1B_{3u}	7,379	0,72	-	5,659	1,14	-
3^1B_{2u}	6,520	-	0,49	5,941	-	0,32
5^1A_g	8,220	-	-	6,296	-	-
4^1B_{2u}	7,564	-	0,99	6,301	-	0,46
4^1B_{3u}	8,101	0,15	-	6,310	0,59	-

Tabelle 2

Anregungsenergien und Oszillatorstärken f von Phenazin aus PPP-S-CI- und PPP-D-CI-Rechnungen.

Zustand	E_{S-CI}/eV	f	E_{D-CI}/eV	f
s_1	3,532	1,02	2,691	0,84
s_2	3,924	0,95	3,219	0,80
s_3	4,607	0,19	3,687	0,17
s_4	5,511	0,29	4,183	0,04
s_5	5,860	0,08	4,795	0,26
s_6	5,925	2,09	4,947	1,27
s_7	6,229	0,92	5,072	0,72
s_8	6,421	0,24	5,154	0,37
s_9	6,909	0,59	5,277	0,82

Tabelle 3

Anregungsenergien und Oszillatorstärken f von 2-Aminophenazin 1 aus PPP-S-CI- und PPP-D-CI-Rechnungen.

Symmetrie	E_{S-CI}/eV	f_x	f_y	E_{D-CI}/eV	f_x	f_y
1^1B_2	3,656	1,40	-	2,682	1,23	-
2^1A_1	3,572	-	0,70	2,711	-	0,46
2^1B_2	4,590	0,21	-	3,634	0,04	-
3^1A_1	5,230	-	0,26	4,001	-	0,08
4^1A_1	5,937	-	0,14	4,516	-	0,36
3^1B_2	5,807	1,52	-	4,615	0,17	-
4^1B_2	5,960	1,70	-	4,903	1,9	-
5^1A_1	6,287	-	0,42	5,000	-	0,14
6^1A_1	6,585	-	0,74	5,092	-	0,27
5^1B_2	6,691	0,56	-	5,197	0,56	-
6^1B_2	7,219	0,13	-	5,616	0,77	-
7^1A_1	7,317	-	0,86	5,627	-	0,37
8^1A_1	7,615	-	0,29	5,749	-	0,21
7^1B_2	7,441	0,39	-	5,841	0,09	-

Tabelle 4

Anregungsenergien und Oszillatorstärken f von
 3,7-Diaminophenazin 3 aus PPP-S-CI- und PPP-D-CI-
 Rechnungen.

Symmetrie	E_{S-CI}/eV	f_x	f_y	E_{D-CI}/eV	f_x	f_y
2^1A_1	3,677	1,46	-	2,647	1,15	-
1^1B_1	3,607	-	0,66	2,966	-	0,62
2^1B_1	4,620	-	0,25	3,672	-	0,23
3^1A_1	5,361	0,59	-	3,887	0,13	-
4^1A_1	5,857	1,65	-	4,323	0,17	-
3^1B_1	5,758	-	0,49	4,777	-	0,28
4^1B_1	6,065	-	0,48	4,943	-	0,35
5^1A_1	6,322	1,48	-	5,046	0,40	-
6^1A_1	6,881	0,66	-	5,148	1,79	-
7^1A_1	7,552	0,22	-	5,262	0,17	-
5^1B_1	6,432	-	0,48	5,393	-	0,28
8^1A_1	7,819	0,05	-	5,598	0,46	-
6^1B_1	6,977	-	0,47	5,884	-	0,45
7^1B_1	7,498	-	0,76	5,895	-	0,10
9^1A_1	8,191	0,21	-	5,948	0,33	-
8^1B_1	8,186	-	0,47	6,040	-	0,32
9^1B_1	8,276	-	0,55	6,089	-	0,62
10^1A_1	8,444	0,14	-	6,446	0,03	-

Tabelle 5

Anregungsenergien und Oszillatorstärken f von
 2,3-Diaminophenazin 6 aus PPP-S-CI- und PPP-D-CI-
 Rechnungen.

3.2 Die experimentellen Elektronenspektren bei 77 K ; Absorptions-, Fluoreszenz- und Polarisationsgrad- spektren

Die Elektronen- und Anisotropiespektren von verschiedenen Aminophenazinen sind in Abbildung 5 - 7 zusammengefaßt* . Die Absorptionsspektren der monosubstituierten Phenazine (Abb. 5) zeigen fünf deutlich ausgeprägte Elektronenbanden. Die längstwellige Bande von 2 ist um etwa 800 cm^{-1} bathochrom gegenüber 1 verschoben. Parallel dazu erfolgt eine Erhöhung des Extinktionskoeffizienten. Die APF-Spektren der Verbindungen sind nahezu identisch. Die längstwellige Bande hat einen Polarisationsgrad zwischen 0,48 und 0,45. Er fällt beim Erreichen der zweiten Bande auf ein tieferes Plateau ab ($P = 0,31 - 0,29$). Im Bereich des dritten Elektronenübergangs erkennt man ein deutliches Minimum des Polarisationsgrads zwischen 30500 und 30600 cm^{-1} ($P = 0,09 - 0,17$). Nach kurzen Wellenlängen hin steigt der Polarisationsgrad wieder an und erreicht im Verlauf der vierten Bande einen Wert von $0,39 - 0,41$. Im Bereich der fünften Bande war uns der Polarisationsgrad aus meßtechnischen Gründen nicht mehr zugänglich.

Alle untersuchten Aminophenazine fluoreszieren bereits bei Raumtemperatur.**Die Monoaminoverbindungen fluoreszieren rot. Der Verlauf des Polarisationsgrades der Fluoreszenz ($P = 0,46 - 0,40$) zeigt an, daß die Fluoreszenzbande in gleicher Richtung polarisiert ist, wie die längstwellige Absorptionsbande.

* Die Spektren der einzelnen Verbindungen werden im experimentellen Teil Kapitel 6.5 gezeigt.

**Die Fluoreszenzintensität ist stark unterschiedlich.

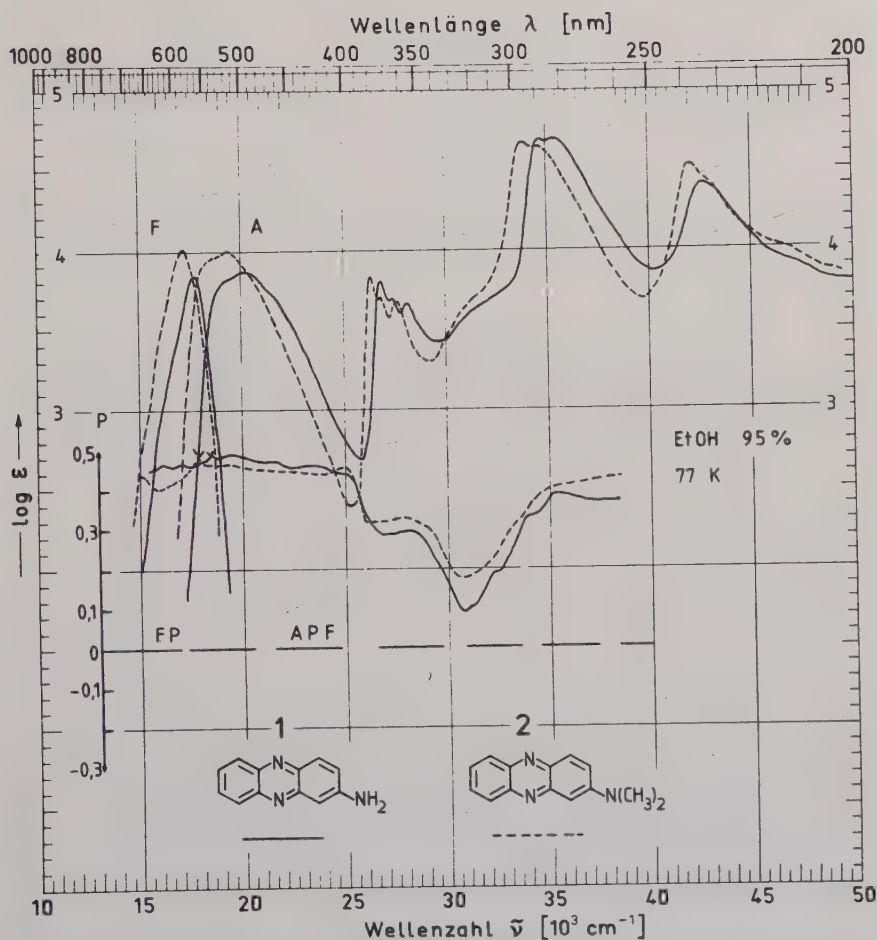


ABBILDUNG 5

Experimentelle Elektronenspektren von 2-Aminophenazin 1 und 2-Dimethylaminophenazin 2. A Absorptionsspektrum, F Fluoreszenzspektrum, APF Absorptionspolarisations-Spektrum bezogen auf die Fluoreszenz, FP Fluoreszenz-polarisations-Spektrum.

Die Absorptionsspektren der 3,7-diaminosubstituierten Phenazine (Abb. 6) zeigen ein langwelliges und ein kurzwelliges Bandensystem. Sie sind durch ein deutliches Minimum voneinander getrennt. Der langstwellige Elektronenübergang ist nicht schwingungsstrukturiert, aber scharf im Vergleich zu den anderen Substitutionstypen. Die langstwellige Bande von 4 bzw. 5 ist um ca. 600 cm^{-1} bathochrom gegenüber 3 verschoben. Gleichzeitig erhöht sich die Intensität des Übergangssoszillators.

Nach Auskunft des APF-Spektrums liegt im Minimum des Absorptionsspektrums eine schwache Bande, die senkrecht zum Grundoszillator polarisiert ist. Der Polarisationsgrad erreicht hier im Bereich von 29500 cm^{-1} ein Minimum. Ein zweites Minimum liegt im Bereich von 33500 cm^{-1} . Zwischen diesen beiden Minima liegt ein Maximum mit $P = 0,36 - 0,38$. Das entspricht einem Elektronenübergang, der, ebenso wie der Oszillator der Hauptbande, bei $35400 - 35900\text{ cm}^{-1}$ parallel zur langstwelligen Bande polarisiert ist.

Die Verbindungen dieses Strukturtyps fluoreszieren rot. Die Maxima der Fluoreszenz liegen einheitlich bei etwa 18000 cm^{-1} . Die Fluoreszenz liegt spiegelsymmetrisch zur Absorption. Die Polarisation ist nach dem Verlauf des FP-Spektrums gleichgerichtet zum Oszillator der langstwelligen Bande.

Auch bei den 2,3-diaminosubstituierten Phenazinen (Abb. 7) beobachtet man ein langwelliges und ein kurzwelliges Bandensystem. Sie sind wiederum durch ein deutliches Minimum voneinander getrennt. Der langstwellige Elektronenübergang zeigt eine deutliche Schwingungsstruktur, die um so mehr hervortritt, je

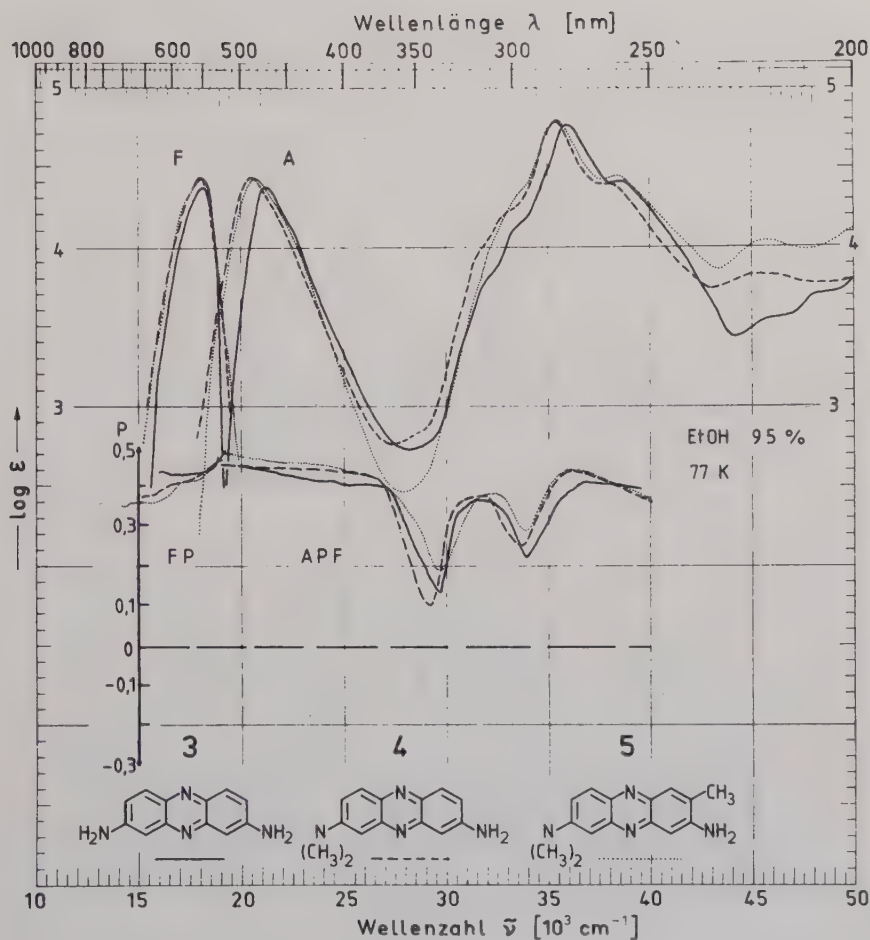


ABBILDUNG 6

Gemessene Elektronenspektren von 3,7-Diaminophenazin 3, 3-Amino-7-dimethylaminophenazin 4 und 2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin 5. Legende siehe Abb.5.

starrer die Substituenten an das Phenazingerüst gebunden sind. Bei 7 ist erwartungsgemäß keine Schwingungsstruktur mehr zu erkennen. Nach vollständiger Methylierung der Aminogruppen ist das Maximum von 7 gegenüber 6 um 1400 cm^{-1} bathochrom verschoben. Parallel zur geometrischen Fixierung der Aminogruppen steigt die Stärke des Grundoszillators an.

Die APF-Spektren sind hier am deutlichsten ausgeprägt und wiederum sehr ähnlich. Sie korrelieren mit dem Absorptionsspektrum. Man erkennt im Bereich von 30000 cm^{-1} und 35000 cm^{-1} Übergänge, die senkrecht zur längstwelligen Bande polarisiert sind. Nach Auskunft des APF-Spektrums liegt im Bereich von 33000 cm^{-1} ein Übergang, der parallel zur Hauptbande bei $36700 - 38300\text{ cm}^{-1}$ polarisiert ist.

Die 2,3-diaminosubstituierten Phenazine fluoreszieren stark grün. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt mit der geometrischen Fixierung der Aminosubstituenten stark zu. Demzufolge fluoresziert 8 am stärksten. Analog verläuft auch die Strukturierung der Fluoreszenzbande, die bei den verwendeten Konzentrationen ($c = 10^{-5}\text{ mol/l}$) spiegelsymmetrisch zur längstwelligen Absorptionsbande liegt. Die Fluoreszenzbande ist nach Aussage des APF-Spektrums gleich polarisiert wie die längstwellige Absorptionsbande.

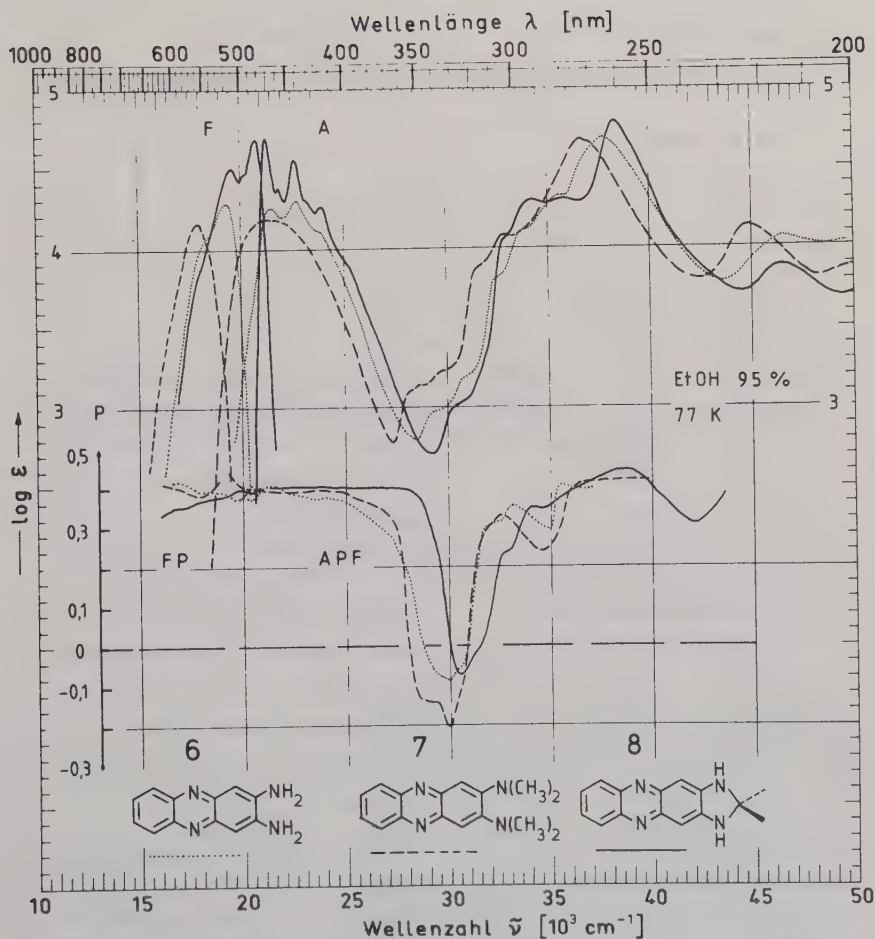


ABBILDUNG 7

Gemessene Elektronenspektren von 2,3-Diaminophenazin 6, 2,3-Bis-(dimethylamino)-phenazin 7 und 2,2-Dimethyl-1,3-diazolin-(b)-phenazin 8. Legende siehe Abb. 5.

Tabelle 6

Spektroskopische Daten der Verbindungen 1 - 8

F Fluoreszenz, A Absorption, P Polarisationsgrad

2-Aminophenazin <u>1</u>			2-Dimethylaminophenazin <u>2</u>		
$F(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P	$F(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P
17750		+0,46	17150		+0,43
$A^a(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P	$A^a(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P
20500	3,87	+0,48	19250	4,00	+0,46
26800	3,81	+0,29	26300	3,83	+0,32
30600 ^b	3,57	+0,09 ^c	30500 ^b	3,58	+0,17 ^c
34700	4,69	+0,34	33800	4,68	+0,36
42700	4,41		42000	4,54	
$\lambda_A = 21320 \text{ cm}^{-1}$			$\lambda_A = 21410 \text{ cm}^{-1}$		
$\lambda_F = 17790 \text{ cm}^{-1}$			$\lambda_F = 17240 \text{ cm}^{-1}$		

3,7-Diaminophenazin <u>3</u>			3-Amino-7-dimethylamino-phenazin <u>4</u>		
$F(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P	$F(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P
18200		+0,44	1800		+0,43
$A^a(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P	$A^a(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P
21200	4,38	+0,44	20600	4,44	+0,45
29500 ^b	2,82	+0,13 ^c	29200 ^b	2,88	+0,10 ^c
31400 ^b	3,63	+0,37 ^d	32000 ^b	4,01	+0,38 ^d
33700 ^b	4,15	+0,22 ^c	33400 ^b	4,24	+0,25 ^c
35900	4,78	+0,38	35400	4,78	+0,42
38600	4,42	+0,40	38100	4,40	+0,41
45600	3,54		45500	3,79	
$\lambda_A = 23810 \text{ cm}^{-1}$			$\lambda_A = 22300 \text{ cm}^{-1}$		
$\lambda_F = 18250 \text{ cm}^{-1}$			$\lambda_F = 18000 \text{ cm}^{-1}$		

Tabelle 6, Fortsetzung:

2-Methyl-3-amino- 7-dimethylaminophenazin <u>5</u>			2,3-Diaminophenazin <u>6</u>		
$F(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P	$F(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P
18150		+0,43	19300		+0,38
$A^a(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P	$A^a(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P
20700	4,44	+0,47	21450 ^e	4,28	+0,41
29600 ^b	2,76	+0,19 ^c	29700 ^b	2,99	-0,09 ^c
31900 ^b	3,89	+0,38 ^d	33000 ^b	3,88	+0,35 ^d
33800 ^b	4,37	+0,29 ^c	34800 ^b	4,25	+0,29 ^c
35450	4,80	+0,43	37850	4,69	+0,40 ^f
38400	4,45	+0,41	46500	4,06	
45600	4,05				
$\lambda_A = 22300 \text{ cm}^{-1}$			$\lambda_A = 23810 \text{ cm}^{-1}$		
$\lambda_F = 18000 \text{ cm}^{-1}$			$\lambda_F = 19230 \text{ cm}^{-1}$		

2,3-Bis-(dimethylamino)- phenazin <u>7</u>			2,2 -Dimethyl-1,3-diazolin- (b)-phenazin <u>8</u>		
$F(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P	$F(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P
17900		+0,38	20800 ^e		+0,40
$A^a(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P	$A^a(\text{cm}^{-1})$	$\lg \epsilon$	P
21400 ^g	4,20	+0,39	21300 ^e	4,69	+0,40
29900 ^b	3,23	-0,20 ^c	30500 ^b	3,01	-0,07 ^c
32800	4,08	+0,32 ^d	34100	4,29	+0,34 ^d
34400 ^b	4,19	+0,24 ^c	38300	4,78	+0,44 ^d
36700	4,68	+0,41	42000 ^b	3,94	+0,31 ^c
44900	4,14		46600	3,89	
$\lambda_A = 21460 \text{ cm}^{-1}$			$\lambda_A = 25000 \text{ cm}^{-1}$		
$\lambda_F = 17860 \text{ cm}^{-1}$			$\lambda_F = 19600 \text{ cm}^{-1}$		

Tabelle 6, Erläuterungen:

- a Lage des Elektronenübergangs in cm^{-1}
- b Bandenlage aus dem Minimum (Maximum) des APF-Spektrums erschlossen,
- c Minimum des Polarisationsgrades,
- d Maximum des Polarisationsgrades,
- e Lage des 0-0-Übergangs,
- g Maximum der ersten Bande,
- f Polarisationsgrad extrapoliert.

Lösungsmittel: Ethanol 95%

T: 77 K

Das Verhältnis der Konzentrationen $c_{77\text{K}}/c_{298,15\text{K}}$ ergibt für Ethanol 95% den Wert 1,3. Die molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ der Absorptionsspektren bei 77 K wurden entsprechend korrigiert.

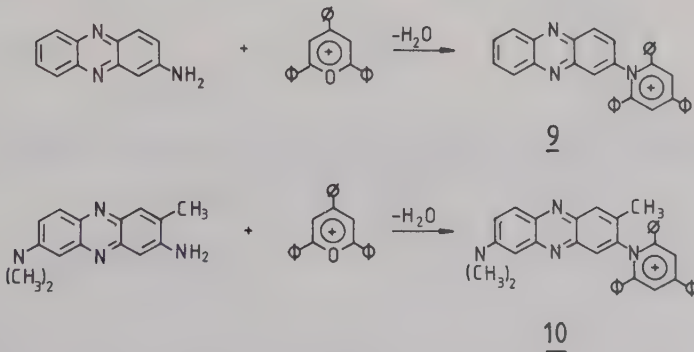
Für die Verbindungen 1 - 8 wurde die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes untersucht. Es ist für den Bereich von $c = 10^{-6}$ - 10^{-2} Mol/l in Ethanol erfüllt.

3.3

Der Einfluß der Aminofunktion auf das
Elektronenspektrum (Absorption)

Die Aminofunktion übt einen entscheidenden Einfluß auf das Elektronenspektrum aus, je nachdem, ob das freie Elektronenpaar sich am π -System des Phenazingrundgerüsts beteiligt oder nicht. Durch gezielte Lokalisation einer positiven Ladung an einer Aminogruppe und gleichzeitiges Herausdrehen dieser Gruppe aus der Ebene des Phenazingrundsystems kann das Elektronenspektrum manipuliert werden.

So wird das Spektrum von Neutralrot 5 (=2M3A7DMAP) in das Spektrum des Dimethylaminophenazins umgewandelt (vgl. Abb. 8). Analog kann man durch Entkoppeln der Aminofunktion des 2-Aminophenazins das Elektronenspektrum des Phenazins 'herstellen' (vgl. Abb. 9). Synthetisch stellt sich das folgendermaßen dar (Gl.5):



(5)

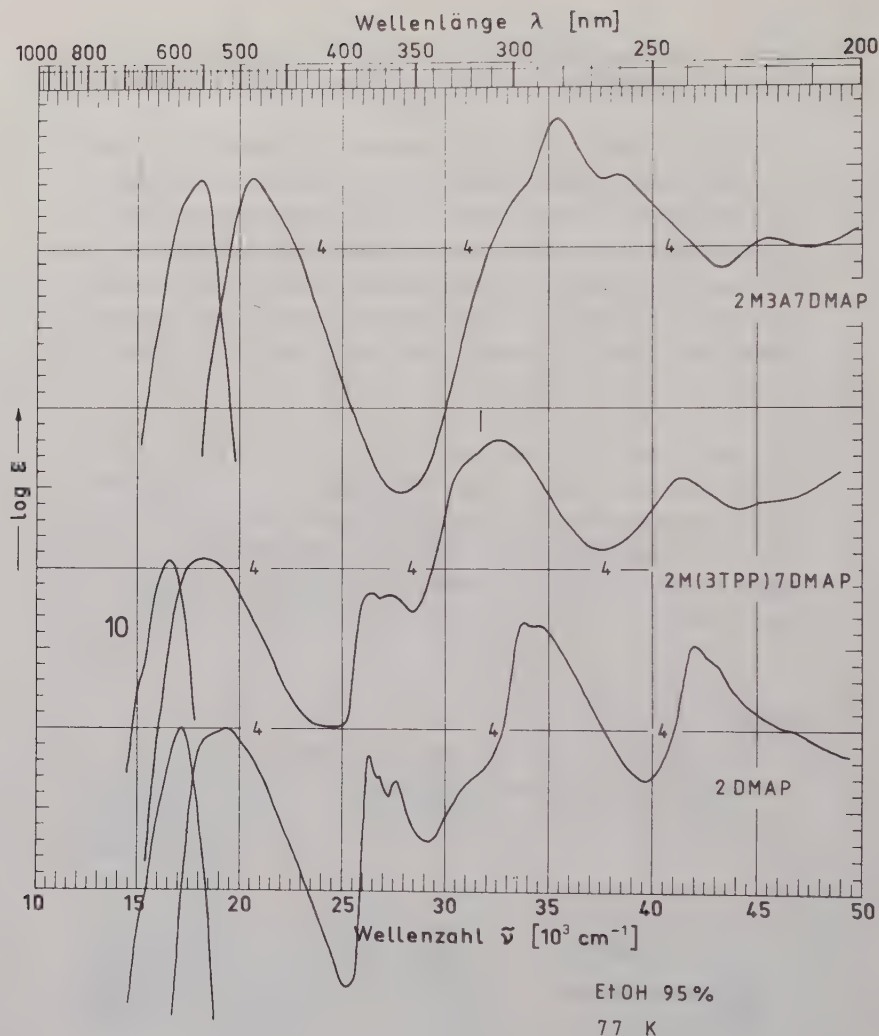


ABBILDUNG 8

Gemessene Elektronenspektren von 2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin (2M3A7DMAP) 5, 2-Methyl-3-[(2,4,6-triphenyl)-pyridinium]-7-dimethylaminophenazin-perchlorat (2M(3TPP)7DMAP) 10 und 2-Dimethylaminophenazin (2DMAP). Die längstwellige Absorption des Pyridiniumrestes ist durch einen Strich gekennzeichnet /26/.

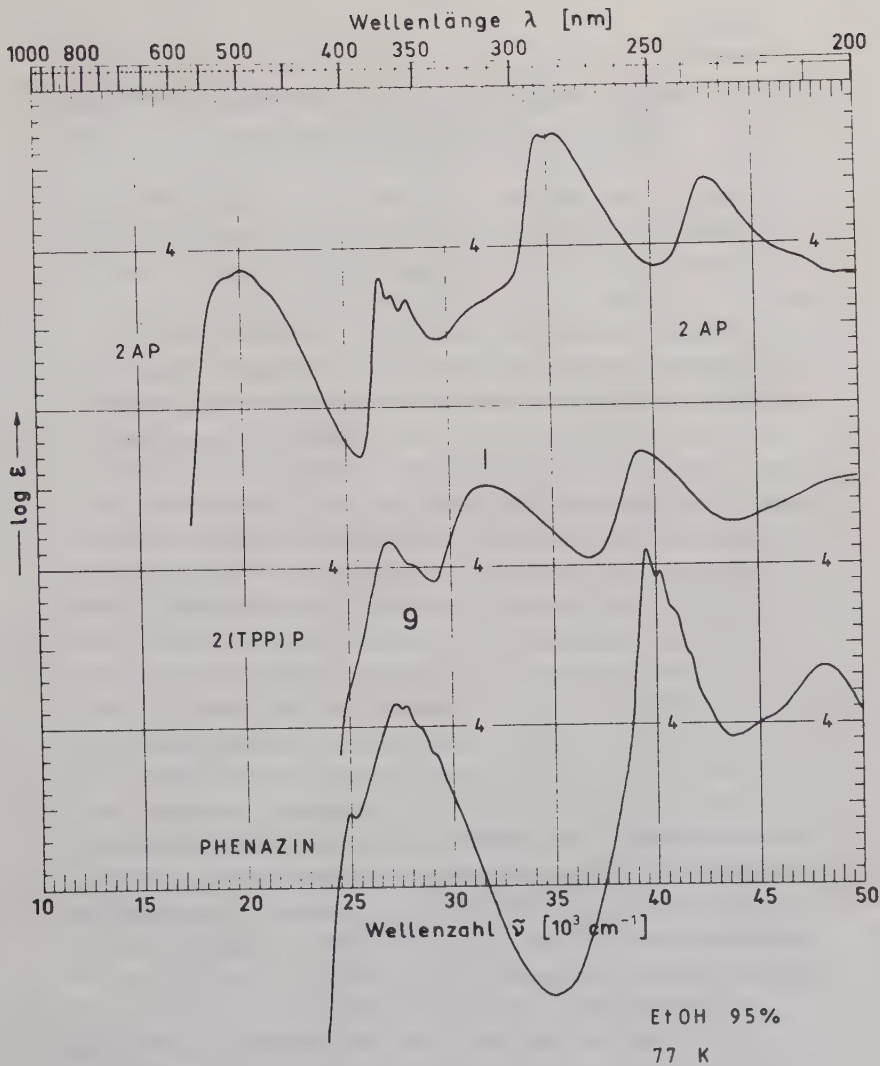


ABBILDUNG 9

Gemessene Elektronenspektren von 2-Aminophenazin (2AP), 2-[(2,4,6-triphenyl)-pyridinium]-phenazin-tetrafluoroborat (2(TPP)P) 9 und Phenazin.

Die längstwellige Absorption der Pyridiniumbande ist durch einen Strich gekennzeichnet /26/.

3.4 Vergleich der Ergebnisse der Modellrechnungen mit den experimentellen Spektren

In den Abbildungen 10 - 13 werden die gemessenen Elektronenspektren des Phenazins und seiner Aminoderivate von Typ 1, 3 und 6 mit den nach Gleichung 4 korrigierten Ergebnissen der PPP-D-CI-Rechnungen verglichen. Die Abbildungen zeigen deutlich, daß die experimentell bestimmten Hauptbanden der untersuchten Verbindungen mit Hilfe der Modellrechnungen den entsprechenden elektronischen Zuständen ohne Schwierigkeiten zugeordnet werden können. Die Übereinstimmung zwischen den berechneten und gemessenen Energien der π - π^* -Übergänge ist offensichtlich recht vernünftig. Semiempirische Modellrechnungen können prinzipiell nur qualitative bzw. halbquantitative Aussagen liefern. Es wurde daher kein Versuch unternommen, die Übereinstimmung zwischen Vorhersagen und den spektralen Beobachtungen durch Optimierung der empirischen Parameter weiter zu verbessern. Stattdessen wurde für den PPP-Modell-Hamilton-Operator eine Parametrisierung verwendet, die sich bei der Untersuchung von Korrelationseffekten in Polyenen /18a/ und Polyacenen /18b/ bewährt hat. Die notwendige Erweiterung des Parametrisierungsschemas für die Beschreibung der Ringstickstoffe sowie der Aminogruppen wurde aus Konsistenzgründen aus der Arbeit von Dewar und Morita /15b/ übernommen (vgl. Abschnitt 2.3.1)

3.4.1 Der Spektralbereich zwischen 20000 cm^{-1} - 30000 cm^{-1}

Das Absorptionsspektrum des Phenazins weist im Bereich zwischen 25000 cm^{-1} und 30000 cm^{-1} ein relativ starkes Bandensystem auf, das den beiden naheliegenden und vergleichbar intensiven 1L_a ($^1B_{2u}$) und 1L_b ($^1B_{3u}$) Zuständen

zuzuordnen ist. (Es ist sowohl aus theoretischen* als auch experimentellen /27/ Gründen zu erwarten, daß im Phenazin ein $n-\pi^*$ -Übergang die niedrigste Singulett-Anregung ist. Die Existenz eines solchen sehr langlebigen Zustands erklärt, warum eine Fluoreszenz bisher nicht beobachtet worden ist).

Das PPP-D-CI-Modell beschreibt den Einfluß von einfacher und zweifacher Aminosubstitution auf das betrachtete Bandensystem des Phenazins in Übereinstimmung mit den Beobachtungen:

Einfache Aminosubstitution in Position 2 (bzw. 3) führt zu einer Aufspaltung in zwei deutlich getrennte Elektronenbanden von vergleichbarer Intensität aber unterschiedlicher Polarisation. Das dem 1L_b (${}^1B_{3u}$)-Zustand zuzuordnende Absorptionsmaximum bei 27200 cm^{-1} behält seine Lage in etwa bei, während die dem 1L_a (${}^1B_{2u}$)-Zustand zuzuordnende Schulter bei 25000 cm^{-1} beträchtlich rotverschoben wird (vgl. Abb. 10 + 11).

Die zweite Aminosubstitution verschiebt die bisher lagekonstante 1L_b -Bande zu niedrigeren Wellenzahlen. Sie bildet nun die energetisch niedrigste $\pi-\pi^*$ -Anregung und überdeckt aufgrund gewachsener Oszillatorstärke den schwächer gewordenen 1L_a -Übergang vollständig. Dieser Umstand sollte dafür verantwortlich sein, daß der 1L_a -Zustand auch im APF-Spektrum nicht zu beobachten ist. Eine ähnliche Situation, wenn auch mit umgekehrtem Vorzeichen, sorgte im Fall des Antracens lange Jahre dafür, daß eine eindeutige Identifikation des schwachen 1L_b -Zustands unter der hier starken 1L_a -Bande nicht möglich war /17,28/.

* Ergebnisse eigener CNDO/S Rechnungen

Die Zuordnung der langwelligsten, sehr intensiven Bande in den zweifach aminosubstituierten Phenazinen (3 und 6) zum 1L_b -Zustand ergibt sich eindeutig aus dem Polarisationsgrad P des APF-Spektrums. P hat im Bereich der niedrigsten Bande einen ähnlichen Wert wie im Bereich der 1B_b -Hauptbande, die in der langen Molekülachse polarisiert ist (vgl. Abb. 12 + 13).

3.4.2 Der spektrale Bereich zwischen 30000 cm^{-1} und 40000 cm^{-1}

Dieser Bereich ist dominiert durch die starke 1B_b -Bande, die durch Aminosubstitution etwa $2000 - 4000\text{ cm}^{-1}$ rotverschoben wird. Die D-CI-Rechnungen liefern für diesen in der x-Achse polarisierten Zustand um einige tausend cm^{-1} zu hohe Anregungsenergien, reproduzieren jedoch in etwa die Aminosubstitutionseffekte. Für das Phenazin sagen die Modellrechnungen zwischen den intensiven 1L_a - und 1L_b -Zuständen sowie dem 1B_b -Zustand drei verbotene elektronische Zustände (1^1B_{1g} , 2^1A_g , 2^1B_{1g}) voraus. Das Symmetrieverbot wird durch die Aminosubstitution aufgehoben, so daß diese Zustände (zumeist) als Schultern in der ansteigenden Flanke der 1B_b -Absorption zu beobachten sind. Zusätzlich erscheinen in diesem Bereich in Übereinstimmung mit den D-CI-Rechnungen noch weitere Banden, die von höher angeregten $\pi-\pi^*$ -Zuständen des Phenazins abstammen (vgl. Abb. 12, 13 und 4).

Betrachten wir das APF-Spektrum beim 2-Aminophenazin 1 (Abb. 11), so läßt sich die Änderung des Polarisationsgrades im Bereich zwischen den 1L_a - und 1B_b -Absorptionen mit den verschiedenen berechneten Zuständen und der Richtung ihrer Dipolübergangsmomente gut korrelieren.

Ähnliches gilt auch für das 2,3-Diaminophenazin 6 (vgl. Abb.13). Beim 3,7-Diaminophenazin 3 (Abb. 12) lassen sich die beiden Minima des Polarisationsgrades P zwar gut auf zwei in der kurzen Achse polarisierte 1A_1 -Zustände zurückführen; jedoch sollte das dazwischliegende Maximum von P durch einen in der langen Molekülachse polarisierten 1B_1 -Zustand verursacht sein. Ein solcher Zustand wird aber erst knapp oberhalb der beiden 1A_1 -Zustände beschrieben.

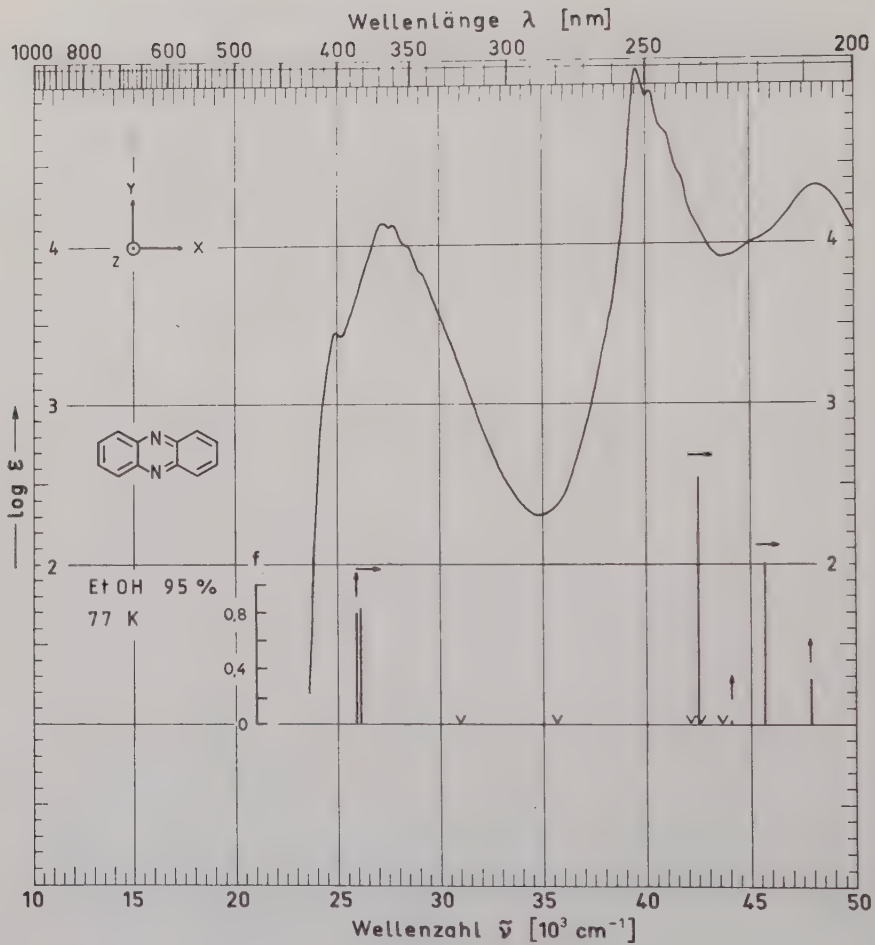


ABBILDUNG 10

Experimentelles und berechnetes Elektronenspektrum von Phenazin. v: Verbotener Übergang.

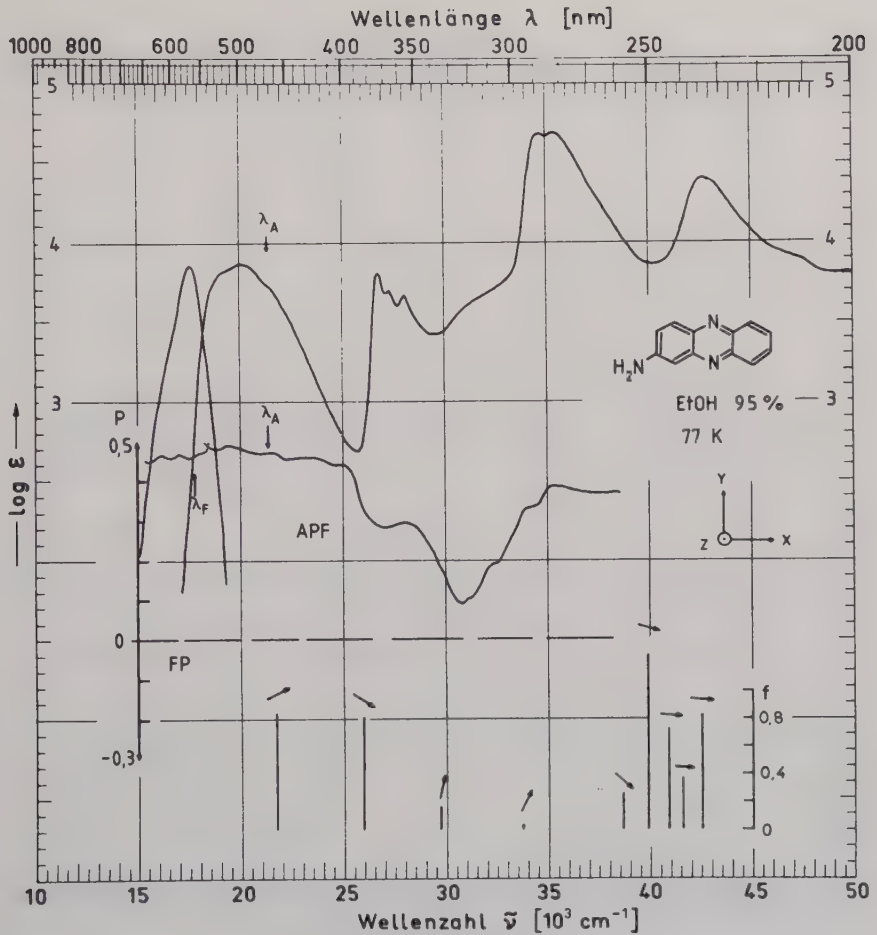


ABBILDUNG 11

Experimentelle und berechnete Elektronenspektren von 2-Aminophenazin 1. P Polarisationsgrad, APF Absorptionspolarisations-Spektrum bezüglich λ_A , FP Fluoreszenzspolarisations-Spektrum bezüglich λ_F , f Oszillatorstärke.

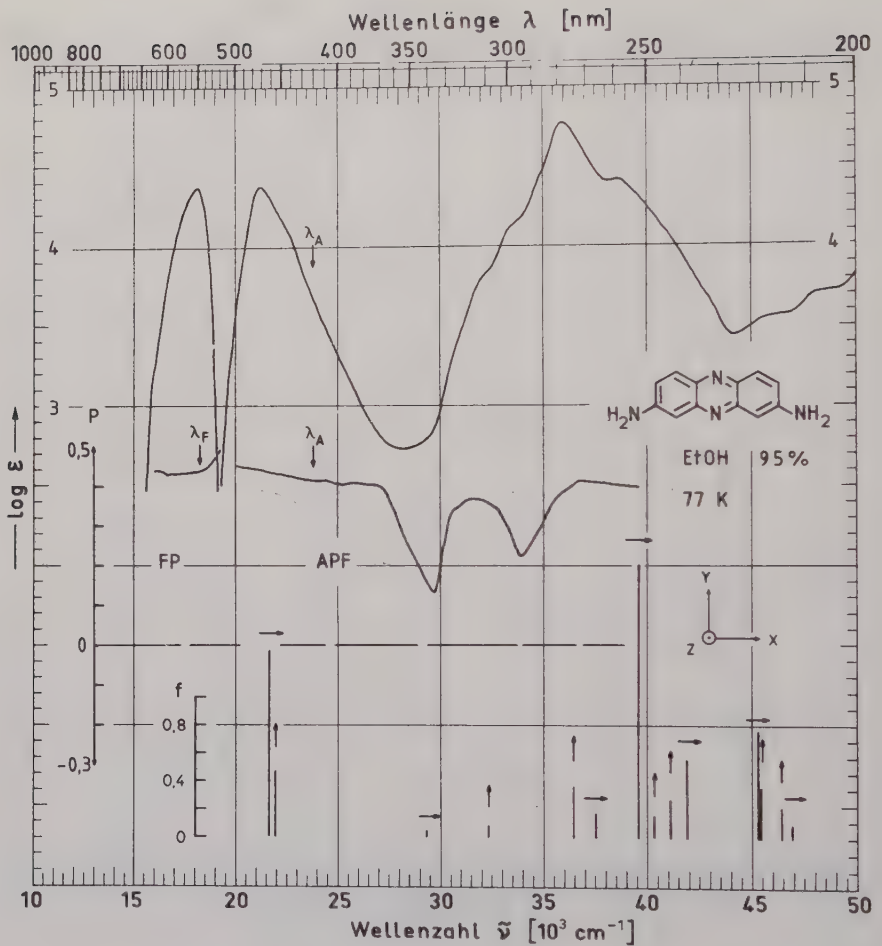


ABBILDUNG 12

Experimentelle und berechnete Elektronenspektren von 3,7-Diaminophenazin **3**. Legende siehe Abb. 11.

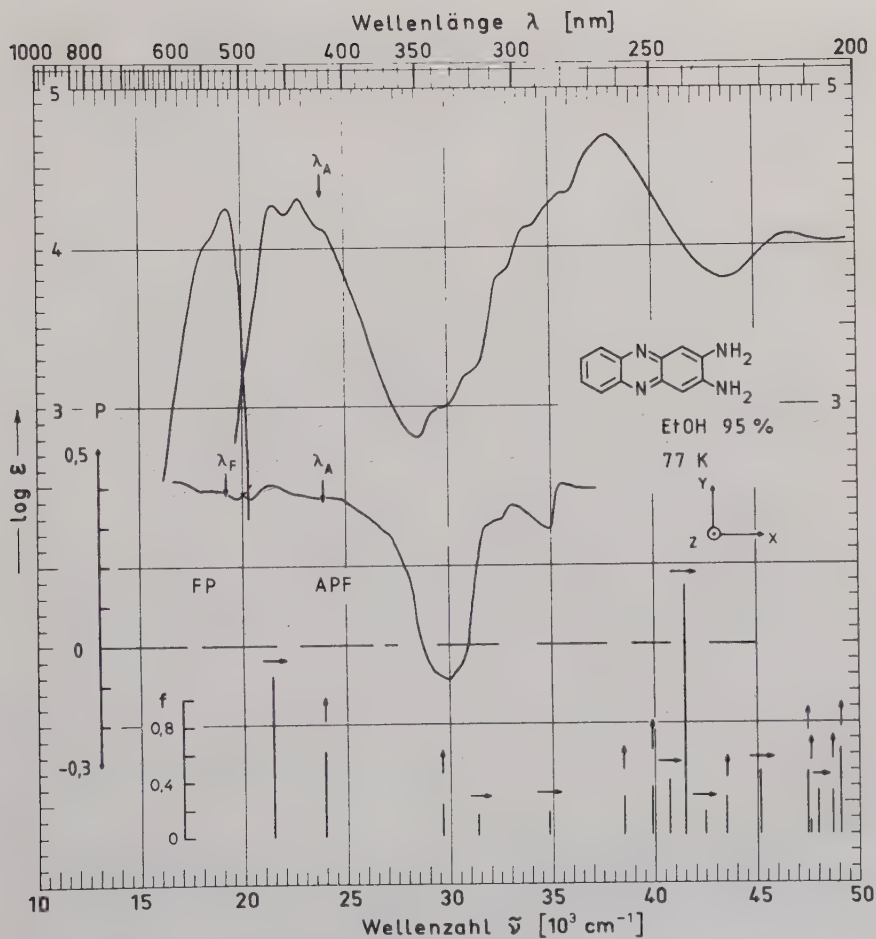
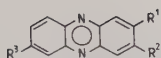


ABBILDUNG 13

Experimentelle und berechnete Elektronenspektren von 2,3-Diaminophenazin 6. Legende siehe Abb. 11.

3.5 Lösungsmittelabhängigkeit der Absorptionsspektren der Aminophenazine bei 25°C

Die Absorptionsspektren der Aminophenazine hängen vom Lösungsmittel ab. Während in den verschiedenen Solventien die Form des Spektrums weitgehend erhalten bleibt, ist seine Lage lösungsmittelabhängig. Die kurzwelligste Absorption beobachtet man in Benzol. In polareren Lösungsmitteln erscheint das Spektrum bathochrom verschoben. Tabelle 7 zeigt dies in Bezug auf das Maximum der längstwelligen Bande. Sie reagiert am empfindlichsten auf Lösungsmittelleinflüsse. Die Verschiebung in Ethanol gegenüber Benzol beträgt hier ca. $800 - 1400 \text{ cm}^{-1}$; d.h. das basische Molekül ist im Grundzustand relativ unpolar. Durch Anregung in höhere Elektronenzustände wird das Molekül durch Ladungsverschiebung stärker polarisiert. Polare Lösungsmittel wirken jetzt stärker stabilisierend als unpolare. Dadurch verschiebt sich die Anregungsenergie ins Langwellige.



Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	Maximum der längstwelligen Bande (cm ⁻¹)			
				EtOH 96%	H ₂ O/ EtOH 1%	Dioxan	Benzol
<u>1</u>	H	NH ₂	H	21250* 27500	22300* 27200	22700* 27950	23100* 27900
<u>2</u>	H	N(CH ₃) ₂	H	20300* 27200	19900* 26800	21300* 27600	21300* 27600
<u>3</u>	H	NH ₂	NH ₂	22400	23200	23400	23700
<u>4</u>	H	NH ₂	N(CH ₃) ₂	21650	21900	22700	22900
<u>5</u>	CH ₃	NH ₂	N(CH ₃) ₂	21700	22200	22750	23100
<u>6</u>	NH ₂	NH ₂	H	23400	24100	24300	24400
<u>7</u>	N(CH ₃) ₂	N(CH ₃) ₂	H	22450	21700	23300	23250
<u>8</u>	$\begin{array}{c} \text{—HN—C—NH—} \\ \quad \diagdown \quad \diagup \\ \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$		H	22000**	22000** Schulter	23050**	23200**
Dipolmoment $\mu \cdot 10^{30}$ (Cm)***				5,77	6,07	1,50	0,0
Dielektrizitätskonstante E				24,55	78,39	2,21	2,28
25°C / 29/							

Tabelle 7

Lösungsmittelabhängigkeit der Absorptionsspektren.

* Maximum der beiden ersten Elektronenübergänge

** Lage des 0-0-Übergangs

*** (Cm = Coulombmeter), 1 Debye = 10^{-18} esu
 = $3,336 \cdot 10^{-30}$ Coulombmeter

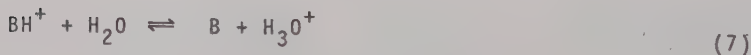
4. EINIGE EIGENSCHAFTEN IM GRUNDZUSTAND4.1 Die pK_s -Werte

4.1.1 Methodische Grundlagen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gleichgewichtskonstanten K_s spektroskopisch gemessen. Diese Methode hat gegenüber dem Meßverfahren der potentiometrischen Titration den Vorteil größerer Empfindlichkeit und Genauigkeit /31/. Dies ist bei Substanzen, wie den vorliegenden Phenazinderivaten, die in der Regel in wässrigen Pufferlösungen schwer löslich sind, vorteilhaft. Die Aminophenazine stehen im Gleichgewicht mit ihren korrespondierenden Kationensäuren:



Allgemein gilt:



Es gilt

$$K_s = \frac{(\text{B}) (\text{H}_3\text{O}^+)}{(\text{BH}^+)} \quad (8)$$

$$- \lg K_S = - \lg (H_3O)^+ - \lg \frac{(B)}{(BH^+)} \quad (9)$$

$$pK_S = pH - \lg \frac{(B)}{(BH^+)} \quad (10)$$

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lassen sich für die Konzentrationen der Kationensäure und der Base die entsprechenden Extinktionen E_{BH^+} und E_B sowie die Gesamtextinktion E einführen (Gl. 11).

$$pK_S = pH - \lg \frac{E^\lambda - E_{BH^+}^\lambda}{E_B^\lambda - E^\lambda} \quad (11)$$

Zur Berechnung des pK_S -Wertes bestimmt man die Extinktion E^λ der Lösung bei gegebener Wellenlänge λ (analytische Wellenlänge) und eingestelltem pH. Der pH-Wert wird mit Hilfe von Pufferlösungen vorgegeben. Außerdem benötigt man die Extinktion der reinen Kationensäure $E_{BH^+}^\lambda$ und der konjugierten Base E_B^λ bei diesem pH-Wert und der analytischen Wellenlänge λ .

Liegt ein Gleichgewicht vor, so tritt EIN isosbestischer Punkt auf. Sind mehrere isosbestische Punkte zu beobachten, so liegen im einfachsten Fall gekoppelte Gleichgewichte vor. Aus Gleichung 10 erkennt man, daß der pH-Wert der Lösung zwei Einheiten vom pK_S -Wert entfernt sein muß, damit 99% der Base oder Kationensäure in der Lösung vorliegen. Die pK_S -Werte von zwei Gleichgewichten müssen sich um 4 pH-Einheiten unterscheiden, damit obige Bedingung erfüllt ist. Ist der Unterschied kleiner, so sinkt der Anteil der reinen Spezies - damit steigt die Fehlergrenze bei Bestimmung des pK_S -Wertes stark an.

Da die Aminophenazine im wässrigen Puffersystem schwer löslich sind, ist es nötig ethanolische Pufferlösungen zu verwenden. Der ermittelte pK-Wert hängt vom Verhältnis Wasser/Ethanol ab /32,7/. Es wurden deshalb 1 Vol % ige ethanolische Pufferlösungen verwendet. Hier liegt die pK-Wert Änderung innerhalb der Fehlergrenzen der Messung /32/.

Nach Gleichung (8) wurden unsere Gleichgewichte unter Benutzung der Konzentration formuliert. In Wirklichkeit ist aber die Wasserstoffionenaktivität maßgebend. Das Gleichgewicht (Gl. (10)) lautet demnach exakter unter Benutzung der Aktivitätskoeffizienten:

$$p_a K' = p_a H - \lg \frac{(B) f_B}{(BH^+) f_{BH^+}} \quad (12)$$

oder

$$p_a K' = p_a H - \lg \frac{(B)}{(BH^+)} - \lg \frac{f_B}{f_{BH^+}} \quad (13)$$

bzw.

$$p_a K' = - \lg \frac{a_{H^+} f_B}{f_{BH^+}} - \lg \frac{(B)}{(BH^+)} \quad (14)$$

$$- \lg \frac{a_{H^+} f_B}{f_{BH^+}} \quad \text{ist die Hammet'sche Säurefunktion } H_o ,$$

so daß man vereinfacht schreiben kann

$$p_a K' = H_0 - \lg \frac{(B)}{(BH^+)} \quad (15)$$

Die nach Gleichung 11 bestimmten pK -Werte entsprechen demnach den $p_a K'$ -Werten nach Gleichung 15 .

Um die Extinktionen der reinen Grenzformen der Kationensäure und ihrer konjugierten Base zu ermitteln, wird die gemessene Extinktion E^λ bei der analytischen Wellenlänge gegen den pH -Wert aufgetragen /33/. Man erhält eine S-förmige Kurve (Abb. 14). Die Extinktionen E_B^λ und $E_{BH^+}^\lambda$ ergeben sich mit ausreichender Genauigkeit aus den Asymptoten an die S-förmige Kurve.

Trägt man den Logarithmus von $\frac{E^\lambda - E_{BH^+}^\lambda}{E_B^\lambda - E^\lambda}$ (siehe Gl.

11) gegen den pH -Wert auf, so ergibt sich eine Gerade, die die pH -Achse im pK -Wert schneidet (Abb. 15). In Abb. 14 und Abb. 15 ist das Verfahren für die Auswertung dargestellt.

Bei der rechnerischen Auswertung ist darauf zu achten, daß gleich viele Meßwerte über und unter dem pK -Wert verwendet werden.

Liegen zwei nahe benachbarte pK -Werte vor, bestimmt man die Extinktion der reinen Spezies zwischen den pK -Werten aus der Extinktion des Wendepunktes der S-Kurve (vgl. Abb. 17). Diese Schwierigkeit kann man umgehen, indem man einen isosbestischen Punkt als analytische Wellenlänge verwendet. Das Verfahren erwies sich bei den 2,3-disubstituierten Phenazinderivaten als sinnvoll und soll hier am Beispiel des 2,2 -Dimethyl-1,3-diazolin-(b)-phenazin veranschaulicht werden.

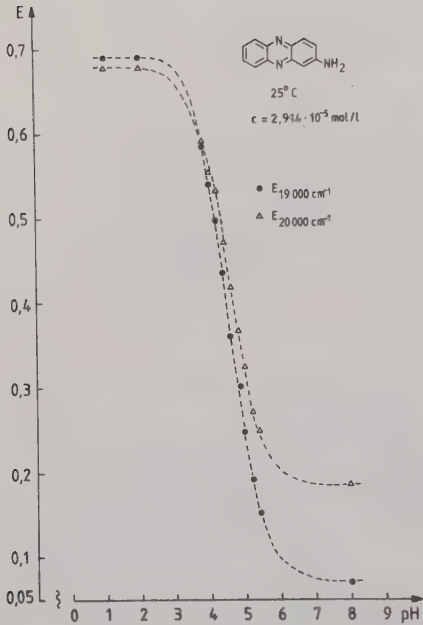


ABBILDUNG 14

Graphische Ermittlung von E_B^λ und E_{BH}^λ bei der analytischen Wellenlänge λ_1 und λ_2 .

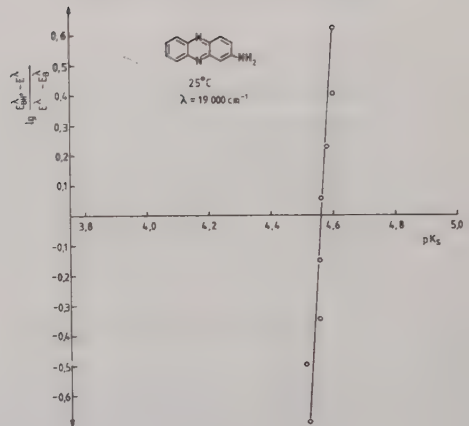


ABBILDUNG 15

Graphische Ermittlung des pK_s -Wertes nach Gleichung 11.

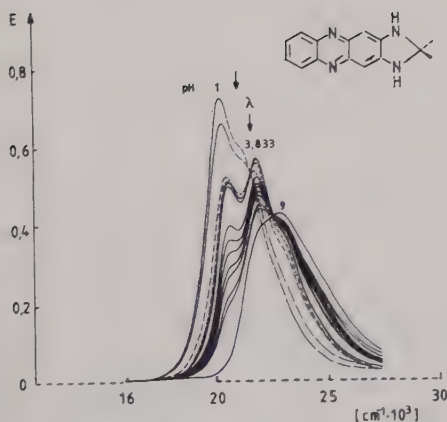


ABBILDUNG 16
Isosbestische Punkte der
beiden pH-abhängigen
Gleichgewichte
 $B + H^+ \rightleftharpoons BH^+ + H^+ \rightleftharpoons BH_2^{++}$

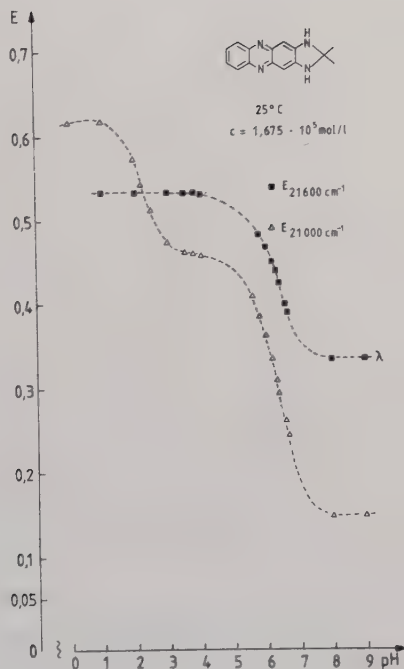


ABBILDUNG 17
Graphische Ermittlung
der Extinktion der
reinen Spezies BH^+ . Der
isosbestische Punkt
von B/BH^+ liegt bei
 21600 cm^{-1} .

4.1.2 Experimentelle Ergebnisse und ihre Deutung

Wie aus Tabelle 8 zu ersehen ist, liegen die pK_s -Werte des ersten Gleichgewichts $BH^+ + H_2O \rightleftharpoons B + H_3O^+$ zwischen $pK_s = 3$ und $pK_s = 7$. Erwartungsgemäß steigt die Basizität (d.h. der pK_s -Wert) mit der Anzahl der Aminosubstituenten. Ebenso ist beim Übergang von der Amino- zur Dimethylaminogruppe ein Anstieg des pK_s -Wertes um $\sim 0,5$ Einheiten zu beobachten, wie der Vergleich von 1 und 2, 3 und 4 bzw. 5, sowie bei 6 und 8 belegt. Dieses Verhalten ist vor allem auf die elektronenschiebende Wirkung (induktiver Effekt +I) der Methylgruppen zurückzuführen /7,35/.

4.1.2.1 Basizität und Konformation

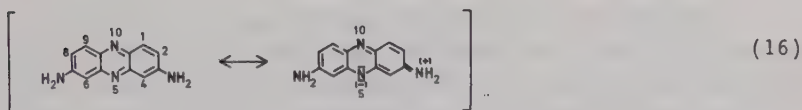
Beim Vergleich der 2,3-disubstituierten Phenazine mit den 3,7-disubstituierten Derivaten sind einige Besonderheiten bezüglich der Basizität zu beobachten. Beim Übergang von 6 zu 7 steigt die Basizität nicht an, sondern sinkt im Gegenteil ab (pK_s : 5,35 $\rightarrow$ 5,17). Dies ist auf die gegenseitige sterische Behinderung der CH_3 -Gruppen am Aminostickstoff zurückzuführen. Aufgrund dessen sind die $N(CH_3)$ -Substituenten so stark aus der x-y Ebene des Phenazingrundgerüsts herausgedreht, daß die Überlappung des doppelt besetzten freien Orbitals am Aminostickstoff mit dem π -System des Molekülgerüsts gestört ist. Der pK_s -Wert von 7 fällt auf die Größenordnung des pK_s -Wertes von 2.

Demgegenüber steigt der pK_s -Wert stark an, wenn man die Aminogruppe durch Ringschluß derart fixiert, daß sie annähernd koplanar zur Molekülebene liegt 8. Es bietet sich daher folgende Schlußfolgerung an: Die Aminosubstituenten sind in Lösung so an den Phenazin-Grundkörper

gebunden, daß eine möglichst große Überlappung der π -Systeme stattfindet. Sterisch kann diese Überlappung gestört werden.

4.1.2.2 Stellung des Protons bei den Kationensäuren

Der pK_s -Wert von 1 ist 4,56. Ein zweiter Aminosubstituent erhöht den pK_s -Wert bei 6 auf 5,35 und bei 3 auf 6,15. Wie ist dieser Unterschied zu erklären? Wie schon Zanker beim Acridin beobachtete /36/, werden bei den Phenazinderivaten zuerst die Ringstickstoffe protoniert. Bei Substitution des Phenazingrundgerüsts mit Aminogruppen verlieren diese beiden Ringstickstoffe 5 und 10 ihre Äquivalenz. Ein Ringstickstoff ist, aufgrund der Mesomerie mit dem freien Elektronenpaar der Aminogruppe, gegenüber Protonierung begünstigt. (Diesen Mesomerieeffekt beobachtete schon Zanker beim 2-Aminoacridin /37/.) Beim 3-Aminophenazin * ist dies der benachbarte Ringstickstoff Nr.5, beim 3,7-Diaminophenazin ebenso.

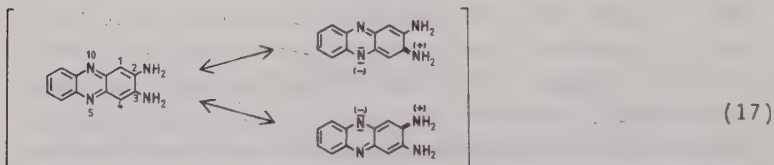


Die basizitätssteigernde Wirkung der Aminogruppen 'addiert' sich. Ringstickstoff 5 ist stärker basisch als Ringstickstoff 10 (vgl. Gl.16).

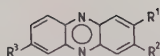
Anders beim 2,3-Diaminophenazin 6. Hier sind beide Ringstickstoffe wieder identisch bezüglich der Basizität. Das erste Proton kann in Stellung 1 oder

* 3-Aminophenazin = 2-Aminophenazin.

in Stellung 10 angelagert werden. Andererseits ist die Wirkung der Aminosubstituenten aufgrund der Mesomerie nicht 'additiv'. 2-NH₂ wirkt bevorzugt auf N-10, 3-NH₂ wirkt bevorzugt auf N-5 (vgl. Gl. 17). Der pK_S-Wert von 6 ist kleiner als der Wert von 3. Eine weitere Folge dieser unterschiedlichen Wirkung der Aminosubstituenten auf die beiden Ringstickstoffe ist bei 6, 7 und 8 die Erhöhung des zweiten pK_S-Wertes. pK_S(1) und pK_S(2) liegen jetzt nur noch um ~ vier pH-Einheiten auseinander.



Wenn man bei 5 die freie Aminogruppe entkoppelt 10, so mißt man das Elektronenspektrum von 2. Der pK_S-Wert von 10 sinkt aber unter den Wert von 2 ab (3,92 ← 4,56). Hier wirkt also die fest fixierte positive Ladung in Stellung 3 zusätzlich zum +M-Effekt und erniedrigt die Basizität am Stickstoff Nr.5 nochmals.



Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	pK _s (1)	pK _s (2)	Isosbestische Punkte	
						pK _s (1)	pK _s (2)
<u>10</u>	CH ₃	2,4,6- [*] TPP	N(CH ₃) ₂	3,92 + 0,03		19500	
<u>1</u>	H	NH ₂	H	4,56 + 0,03		21600	
<u>2</u>	H	N(CH ₃) ₂	H	5,07 + 0,02		20000	
<u>6</u>	NH ₂	NH ₂	H	5,35 + 0,03	1,2 ^{**}	23700	22000
<u>7</u>	N(CH ₃) ₂	N(CH ₃) ₂	H	5,17 + 0,02	1,7 ^{**}	21500	20700
<u>8</u>		-HN - C - NH- CH ₃ CH ₃	H	6,33 + 0,03	2,3 ^{**}	22600	21600
<u>3</u>	H	NH ₂	NH ₂	6,15 + 0,04		22000	
<u>4</u>	H	NH ₂	N(CH ₃) ₂	6,64 + 0,02		20900	
<u>5</u>	CH ₃	NH ₂	N(CH ₃) ₂	6,63 + 0,03		21000	
	H	H	H	1,25 (15 ⁰ C , 10% Methanol /31/) 1,41 (15 ⁰ C , 15% Methanol /32/)			

TABELLE 8

Die pK_s-Werte der Aminophenazine 1 - 9 und 10 bei 25⁰C.
In 1% iger ethanolischer Pufferlösung.

* 2,4,6-TPP = 2,4,6-Triphenyl-pyridinium

** BH₂⁺⁺ wurde extrapoliert.

4.2 Die ^1H -NMR-Spektren der Aminophenazine

Wir finden bei den untersuchten Verbindungen 1 - 8 drei verschiedene Spektrentypen:

1.) Die Spektren erster Ordnung der Ringe a der Verbindungen 1 - 5 (Typ AMX) und der Protonen H^1 und H^4 der Verbindungen 5 - 8.

2.) Spektren des Typs AA'BB'. Sie sind auf Absorptionen von 4 Spinsystemen derjenigen anellierten Benzolkerne zurückzuführen, die keiner long-range Kopplung aus benachbarten Ringen unterworfen sind. Das ist der Fall

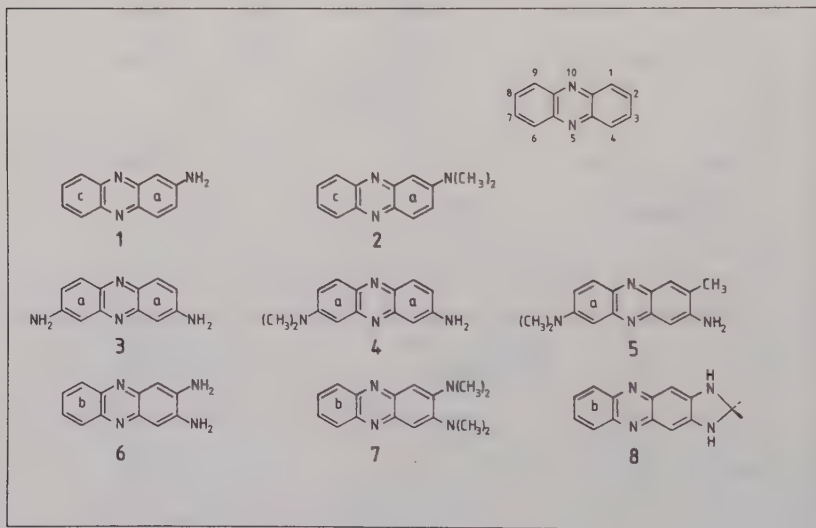


ABBILDUNG 18

Die Spinsysteme der Verbindungen 1 - 8 .

bei endständigen, an einem Heterocyclus annelierten Benzolkernen b von Verbindungen der Symmetrie C_{2v} (6, 7 und 8).

3.) Die vier Protonen des Ringes c erzeugen wegen der geringen Symmetrie des Moleküls 1 und 2 ein ABCD-Spektrum.

4.2.1 Beschreibung der Systeme erster Ordnung

Die Wasserstoffkerne H^1 und H^4 der Verbindungen 6 - 8 ergeben jeweils Einzellinien bei hohem Feld. Die entsprechenden Protonen im Neutralrot 5 haben verschiedene chemische Verschiebung aufgrund der geringen Symmetrie des Moleküls.

Die Protonen der Ringe a der Verbindungen 1 - 5 bilden AMX-Systeme. Es erscheinen drei Signalsysteme: Bei tiefem Feld ein Proton, das ortho koppelt; es folgt zu höherem Feld ein Proton mit Ortho- und Meta-Kopplung und bei höchstem Feld ein Proton mit Meta-Kopplung. Die Signale lassen sich, aufgrund der Kopplungskonstanten, zuordnen. Die Verbindung 3 die C_{2v} -Symmetrie hat zeigt nur ein AMX-System bei zwei Ringen a. Aufgrund der Störung der C_{2v} -Symmetrie bei 4 erkennt man zwei voneinander unabhängige AMX-Systeme, je nachdem ob ein NH_2 - oder ein $N(CH_3)_2$ -Substituent vorhanden ist (Abb. 19 - 21 und Tab. 9 - 11).

4.2.2 Beschreibung der AA'BB'-Systeme

Zu den AA'BB'-Systemen gehören die Protonen der Ringe b in 6, 7 und 8. Die entsprechenden Spektren zeigen zwei zueinander spiegelsymmetrische Signalgruppen

von je vier Hauptlinien. Nach Limbach et. al. /38/ wird die Gruppe bei niedrigem Feld den Protonen zugeordnet, die den Stickstoffatomen benachbart sind (Vergleiche auch H^6 und H^9 bei 1, die durch die Kopplungskonstante J zugeordnet werden können). Das ist auf die Abnahme der Abschirmung der Wasserstoffkerne H^6 und H^9 durch die magnetische Anisotropie der aromatischen Ringe zurückzuführen (Abb. 21, Tab. 11).

4.2.3 Beschreibung der ABCD-Systeme

Alle Protonen der Ringe c in 1 und 2 haben wegen der geringen Molekülsymmetrie unterschiedliche chemische Verschiebung. Das H^6 -Signal erscheint bei tiefstem Feld, daneben, bei etwas höherem Feld, das Signal von H^9 . Es folgen H^8 und H^7 , die zueinander symmetrisch liegen. Die Zuordnung der Signale erfolgte aufgrund von Kopplungskonstanten und von π -Ladungsdichten an den Ringstickstoffatomen (vgl Kapitel 4.4) und Berechnungen, die Limbach et al. /38/ am Phenazin-N-monooxyd durchgeführt hatten (Abb. 19, Tab. 9).

Zu Abbildung 21: 7 ist in dieser Abbildung in $CDCl_3$ gelöst, 6 und 8 in Aceton- d^6 .

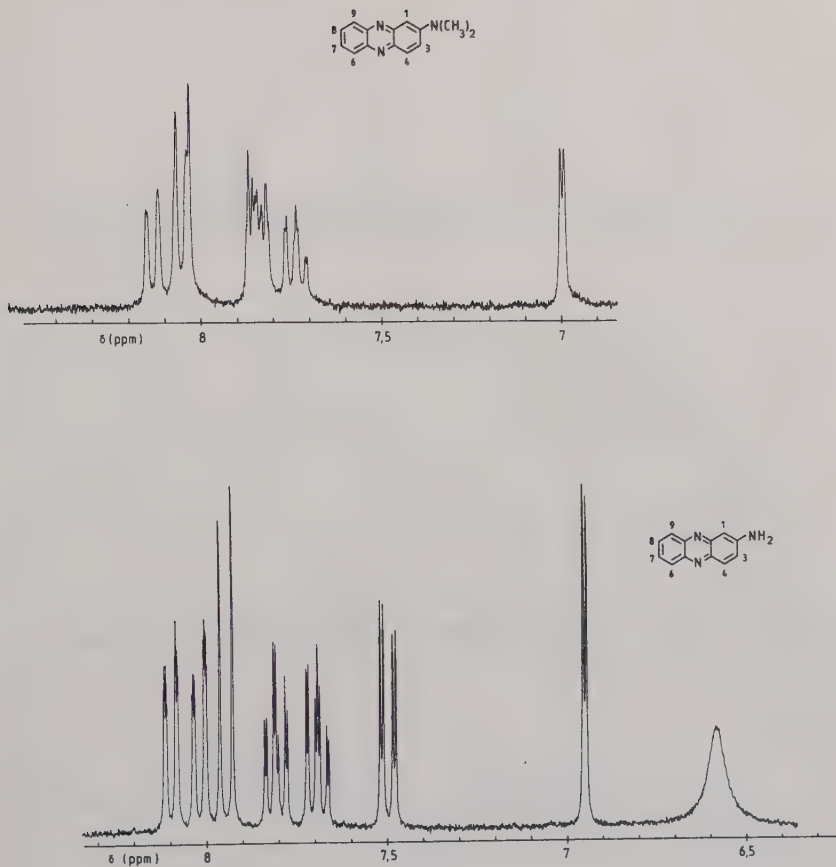


ABBILDUNG 19

Die ^1H -NMR-Spektren von 2-Aminophenazin **1** und 2-Dimethylaminophenazin **2**. Die Chemischen Verschiebungen ν_i [Hz] sind in $\delta_i = \nu_i/270$ [ppm] angegeben. Lösungsmittel: DMSO-d_6

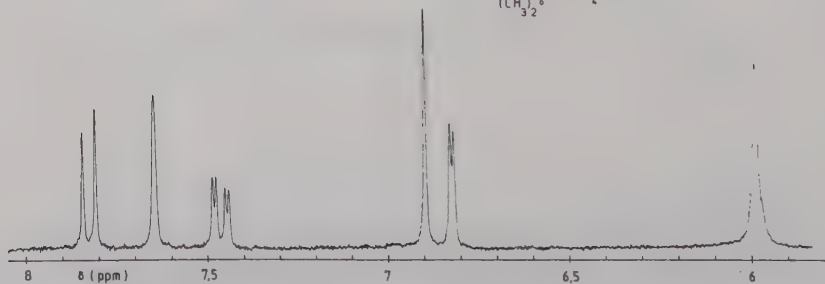
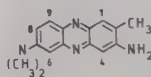
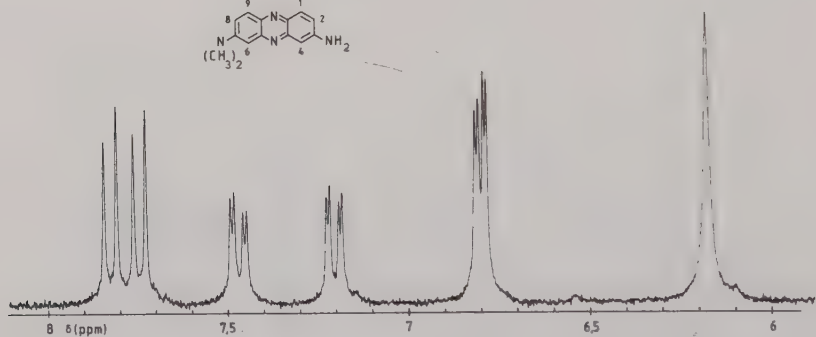
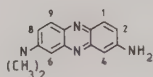
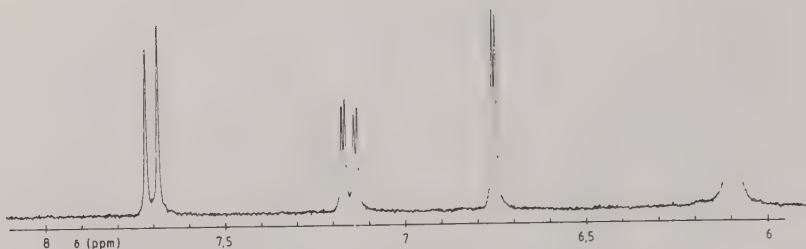
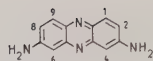


ABBILDUNG 20

Die ^1H -NMR-Spektren von 3,7-Diaminophenazin 3, 3-Amino-7-dimethylaminophenazin 4 und Neutralrot 5. Legende siehe Abb. 19.

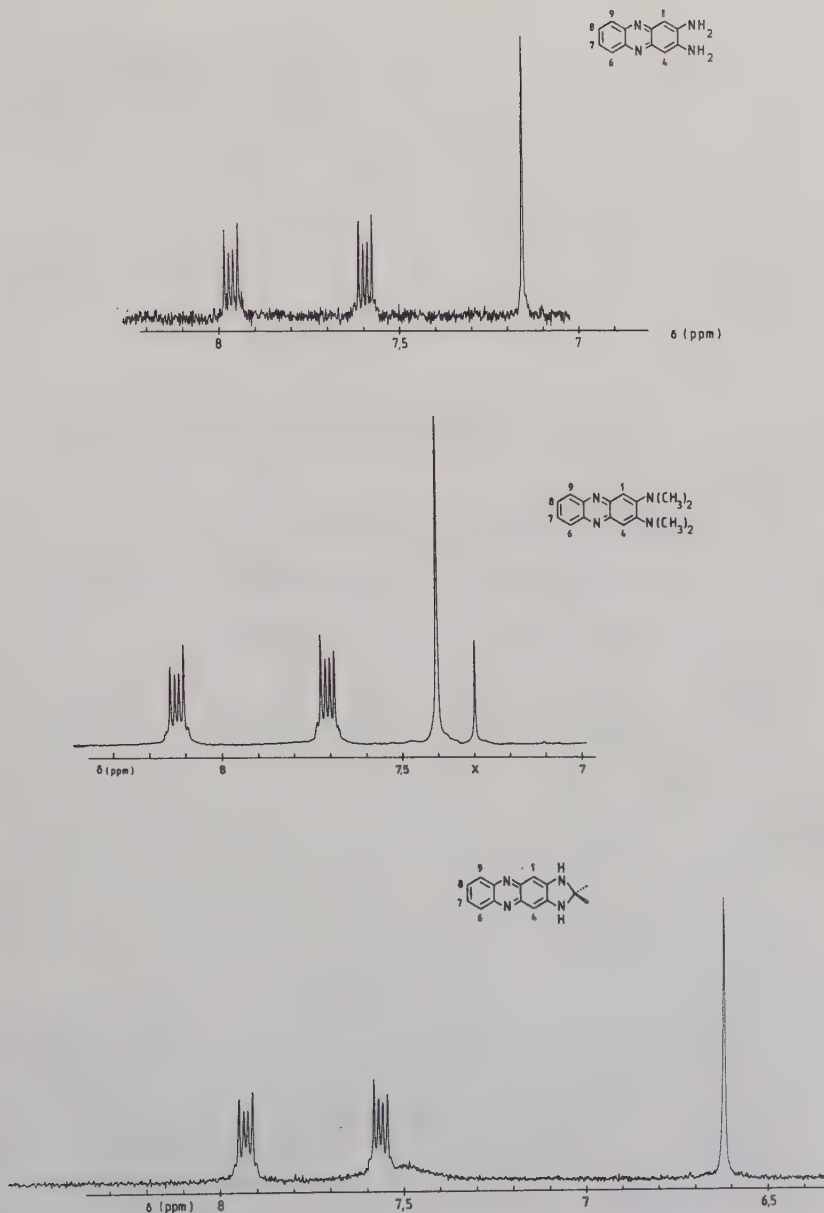


ABBILDUNG 21

Die ^1H -NMR-Spektren von 2,3-Diaminophenazin **6**, 2,3-Bis-(dimethylamino)-phenazin **7** und 2,2 -Dimethyl-1,3-diazolin-(b)-phenazin **8**. Legende siehe Abb.19. In Aceton- d_6 .

2-Aminophenazin <u>1</u>		2-Dimethylaminophenazin <u>2</u>
H ¹ (J:H ¹ ,H ³)	6,95 (d) (2,5)	6,99 (d) (~3)
H ³ (J:H ³ ,H ⁴)	7,50 (dd) (9,5)	7,84 (dd) (10)
H ⁴	7,94 (d)	8,04 (d)
H ⁶ *	8,095 (ddd)	~8,13 (dd)
H ⁷ *	7,69 (ddd)	7,73 (ddd)
H ⁸ *	7,81 (ddd)	7,84 (ddd)**
H ⁹ *	8,02 (ddd)	~8,05 (dd)**
H ⁶ ,H ⁹ : J _{ortho} (8,5) J _{meta} (1,5) J _{para} (~0,5)		J _{ortho} (~9,0)
H ⁷ ,H ⁸ : J _{ortho} (8,5)(7) J _{meta} (1,5)		J _{ortho} (8,5)(7) J _{meta} (1,5)
NH ₂	6,58	—
N(CH ₃) ₂	—	3,20

Tabelle 9

Chemische Verschiebung und Kopplungskonstanten der Protonen der Verbindungen 1 + 2. Die Chemischen Verschiebungen ν_i [Hz] sind in $\delta_i = \nu_i/270$ [ppm] angegeben. Die Kopplungskonstanten J sind in [Hz] angegeben.

* δ von H⁶ bzw. H⁹ und H⁷ bzw. H⁸ sind durch π -Elektronendichten zugeordnet, ** durch die Kopplungskonstante zugeordnet, d = Duplett, Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

Verbindung:	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
H ¹ (J:H ¹ ,H ²)	7,71 (d) (9,0)	7,75 (d) (9,0)	7,65 (s)
H ² (J:H ² ,H ⁴)	7,15 (dd) (2,5)	7,21 (dd) (2,5)	—
H ⁴	6,76 (d)	6,79 (d)	6,90 (s)
H ⁶ (J:H ⁶ ,H ⁸)	6,76 (d) (2,5)	6,82 (d) (~3,0)	6,83 (d) (~3,0)
H ⁸ (J:H ⁸ ,H ⁹)	7,15 (dd) (9,0)	7,47 (dd) (9,5)	7,47 (dd) (9,5)
H ⁹	7,71 (d)	7,83 (d)	7,83 (d)
NH ₂	6,10	6,18	5,99
N(CH ₃) ₂	—	3,13	3,13
CH ₃	—	—	2,36

Tabelle 10

Chemische Verschiebung und Kopplungskonstanten der Protonen der Verbindungen 3 - 5. Die Chemischen Verschiebungen ν_i [Hz] sind in $\delta_i = \nu_i/270$ [ppm] angegeben. Die Kopplungskonstanten J sind in [Hz] angegeben. s = Singulett, d = Duplett, Lösungsmittel DMSO-d⁶.

Verbindung:	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>
H ¹	7,16 (s)	7,37 (s) 7,39 ^a (s)	6,62 (s)
H ⁴	7,16 (s)	7,37 (s) 7,39 ^a (s)	6,62 (s)
H ^{6,9}	7,97	8,10 8,12 ^a	7,93
H ^{6,9,7,8}	7,78 (m)	7,92 (m) 7,91 ^a (m)	7,75 (m)
H ^{7,8}	7,60	7,75 7,70 ^a	7,56
NH ₂ 8: -NH-	5,63	—	7,50
N(CH ₃) ₂	—	3,06 3,03 ^a	—
C(CH ₃) ₂	—	—	1,66

Tabelle 11

Chemische Verschiebung und Kopplungskonstanten der Protonen der Verbindungen 6 - 8. Die Chemischen Verschiebungen ν_i [Hz] sind in $\delta_i = \nu_i/270$ [ppm] angegeben.

s = Singulett, m = Multipllett, Lösungsmittel: Aceton-d⁶,
a Lösungsmittel: CDCl₃.

4.3 Korrelation der ^1H -NMR-Daten mit den pK_s -Werten der Verbindungen 6, 7 und 8.

Die Verbindungen 6, 7 und 8 liefern jeweils zwei verschiedene Spinsysteme: Die Kerne H^1 und H^4 , die den Aminosubstituenten benachbart sind (Spektrum erster Ordnung), und die Wasserstoffkerne am Ring b (Spektrum vom Typ AA'BB', vgl. Abb.21 und Tab. 11).

Der Einfluß der Aminosubstituenten auf den weit entfernten Ring b ist gering. Er resultiert vor allem aus dem +I-Effekt der Substituenten, die die Elektronendichte im Gesamtsystem etwas erhöhen. Durch die magnetische Anisotropie der aromatischen Ringe werden alle Protonen, auch H^1 und H^4 , etwas mehr entschirmt und erscheinen bei tieferem Feld (Vergleiche 8 gegenüber 6).

Die Signale der Protonen H^1 und H^4 reagieren sehr empfindlich auf die benachbarten Substituenten. Man beobachtet zwischen $\text{H}^{1,4}$ von 8 und von 6 einen Unterschied der chemischen Verschiebung von 0,75 ppm. Hier wirkt sich also die Einbeziehung der freien, doppelt besetzten π -Orbitale der Aminosubstituenten in den benachbarten Ring und die damit verbundene Erhöhung der π -Elektronendichte am C-1 bzw. C-4 deutlich aus (+M-Effekt). Bildet man die Differenz der Chemischen Verschiebung zwischen dem Multispinsystem im Ring b ($\text{H}^6, \text{H}^7/\text{H}^8, \text{H}^9$) und H^1 bzw. H^4 , so kann man diesen +M-Effekt isolieren. Aus Tabelle 12 erkennt man, daß diese Differenzen $\Delta\delta$ mit den pK_s -Werten korrelieren.

Die Aminosubstituenten in Verbindung 8 werden durch sterische Fixierung voll in das π -System des benach-

barten Rings einbezogen. Das freie π -Orbital der Aminogruppe koppelt stark mit dem π -System des Rings. Dadurch wird die π -Elektronendichte am Ringstickstoff erhöht, was zu einer veränderten Protonenaffinität an diesem Zentrum führt (vgl. Tab. 12). Je stärker diese Kopplung durch sterische Hinderung gestört wird, d.h. durch Herausdrehen der Aminogruppen aus der x-y-Ebene des aromatischen Systems, desto geringer wird die π -Elektronendichte im Ring und damit am Ringstickstoff; dies führt zu kleinerem $\Delta\delta$ und niedrigeren pK_S -Werten.

In 7 ist die sterische Anordnung der π -Orbitale der Stickstoffsubstituenten zum Aromaten, wegen der ausgeprägten sterischen Hinderung der ortho-ständigen Dimethylaminogruppen, am ungünstigsten, daher beobachtet man dort den niedrigsten $\Delta\delta$ - und pK_S -Wert ($pK_S = 5,17$, $\Delta\delta = 0,38$).

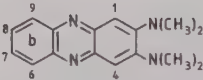
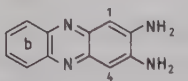
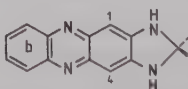
Verbindung	pK_S	$\delta H^{1,4}$	$\delta H^{6,7,8,9}$	$\Delta\delta$ $\delta H^{6,7,8,9} - \delta H^{1,4}$
7 	5,17	7,37	7,75	0,38
6 	5,35	7,16	7,60	0,44
8 	6,33	6,62	7,56	0,94

Tabelle 12

pK_S -Werte der Verbindungen 6 - 8 und Chemische Verschiebung der Protonen der Verbindung 6 - 8 (Vgl. Kap. 4.1. + 4.2).

4.4 Berechnete π -Elektronendichten und π -Bindungsordnungen

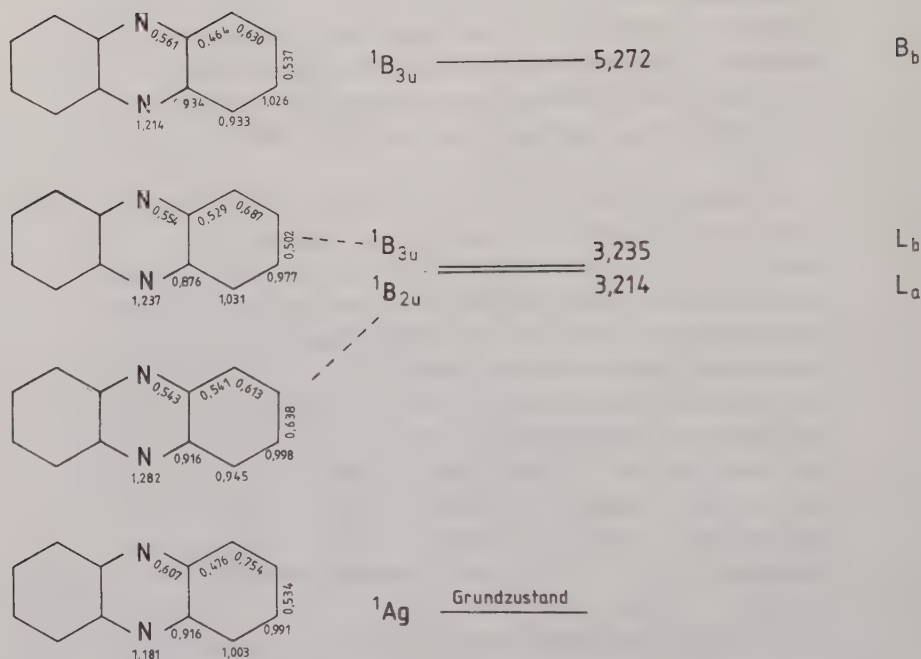
Die Abbildungen 22 - 25 zeigen einen Vergleich der berechneten π -Elektronendichten und π -Bindungsordnungen des Phenazins und der drei Aminoderivate 1, 3 und 6 für die Molekülgrundzustände und die ersten angeregten Singulettzustände (vgl. Kap. 2.3.1).

Im Grundzustand ist die π -Elektronendichte bei allen betrachteten Verbindungen am Ringstickstoff am größten. Bei Anregung, nach den ersten beiden Singulettzuständen, wird diese Elektronendichte weiter verstärkt. Beim Phenazin geschieht dies vor allem auf Kosten des Kohlenstoff-Atoms 4 (bzw. 1,9,6). Sind exocyclische Aminogruppen vorhanden, so erkennt man schon im Grundzustand eine starke Wechselwirkung mit dem Ringsystem. Die Konjugationsfähigkeit der Exo-Aminogruppen steigt weiter bei Anregung in höhere Zustände. Die π -Elektronendichte wird vornehmlich in den mittleren Ring gepumpt, d.h., sie ist an den Ring-Stickstoffen lokalisiert.

Aus Symmetriegründen sind N-5 und N-10 beim Phenazin und beim 2,3-Diaminophenazin 6 identisch. Nicht so beim 2-Amino^{*}- bzw. 3,7-Diaminophenazin (1, 3): Im Grundzustand hat hier der Stickstoff 5 eine höhere π -Elektronendichte als N-10. Dies macht sich bei Protonierung bemerkbar. N-5 wird gegenüber N-10 bevorzugt protoniert.

Betrachtet man die π -Bindungsordnungen, so sieht man im Grundzustand, daß sie alternieren, wie das ausgeprägt bei Cyaninsystemen der Fall ist. Dies beobachteten schon W. Seifert et al. bei 1- und 3-Monoaminoacridinen / 39/. In den angeregten Zuständen wird diese Alternierung schwächer - die Systeme werden 'aromatischer'.

* 2-Aminophenazin = 3-Aminophenazin.

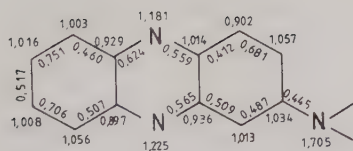


π -Elektronendichten
 π -Bindungsordnungen

Singulettzustände [eV]

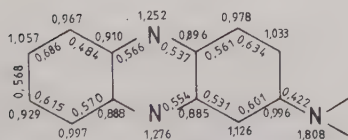
ABBILDUNG 22

Einige berechnete π -Elektronendichten und π -Bindungsordnungen von Phenazin (Grundzustand und 1L_a -, 1L_b -, 1B_b -Zustände nach der Platt'schen Nomenklatur, vgl. Kap. 2.3.3).



S_6 ————— 4,947

'B_g

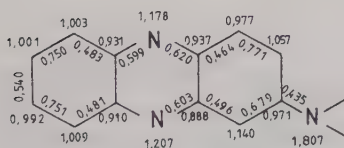
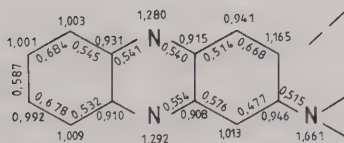


S_2 ————— 3,219

'L_b

S_1 ————— 2,691

'L_a



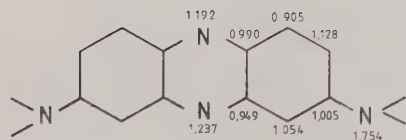
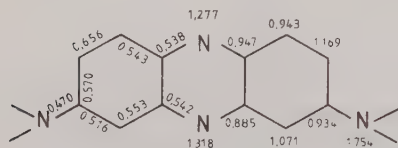
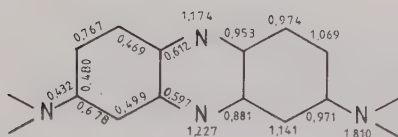
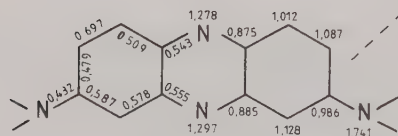
S_0 ————— Grundzustand

π -Elektronendichten
 π -Bindungsordnungen

Singulettzustände [eV]

ABBILDUNG 23

Einige berechnete π -Elektronendichten und π -Bindungsordnungen von 2-Aminophenazin 1. Legende siehe Abb.22.


 $B_2 \text{ ————— } 4,903$
 B_b

 $A_1 \text{ = } 2,711$
 L_a
 $B_2 \text{ = } 2,682$
 L_b

 $A_1 \text{ — } \underline{\text{Grundzustand}}$

π Elektronendichten
 π Bindungsordnungen

Singulettzustände [eV]

ABBILDUNG 24

Einige berechnete π -Bindungsordnungen und π -Elektro-
 nondichten von 3,7-Diaminophenazin 3. Legende siehe
 Abb. 22.

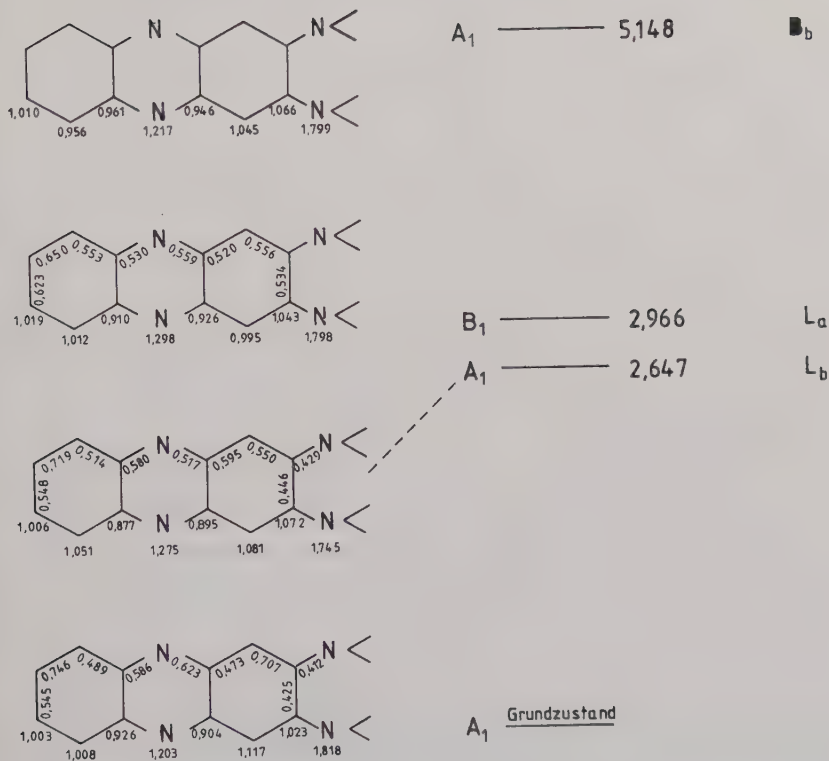


ABBILDUNG 25

Einige berechnete π -Elektronendichten und π -Bindungsordnungen von 2,3-Diaminophenazin. Legende siehe Abb. 22.

4.5 Vergleich der ^1H -NMR-Daten mit den errechneten π -Elektronendichten

Die chemische Verschiebung des NMR-Signals eines H-Atoms ist maßgeblich bestimmt durch die Elektronendichte in der Umgebung des Protons bzw. durch diejenige am Ort des C-Atoms, an das das H-Atom gebunden ist /7, 40/. Bei einer Korrelation der δ -Werte aromatischer Protonen mit π -Elektronendichten an den C-Atomen * müssen Korrekturen an den chemischen Verschiebungen angebracht werden: für Beiträge, die von der magnetischen Anisotropie in den Molekülen, von permanenten und induzierten elektrischen Momenten, von zwischenmolekularer Assoziation und von Lösungsmittel-einflüssen herrühren.

Lösungsmittelleinflüsse konnten, aufgrund der geringen Löslichkeit der untersuchten Verbindungen in herkömmlichen Lösungsmitteln, nicht untersucht werden **. Aus gleichem Grunde war es nicht möglich die zwischenmolekulare Assoziation zu untersuchen.

Die Abschirmung der Wasserstoffkerne durch die magnetische Anisotropie der Moleküle besteht im Wesentlichen aus zwei Anteilen, nämlich der magnetischen Anisotropie, die auf die aromatischen Ringe und derjenigen, die auf die freien Elektronenpaare der Stickstoffatome /41/ zurückgeführt werden kann. Beide Anteile sollten bei ebenen Molekülen die Abschirmung des Magnetfelds am Ort der Wasserstoffkerne erniedrigen.

* Leider konnten wegen zu geringer Löslichkeit in allen zugänglichen Lösungsmitteln keine ^{13}C -Spektren aufgenommen werden.

** Die untersuchten Verbindungen mußten in DMSO-d^6 oder Aceton- d^6 mittels Fourier-Technik aufgenommen werden.

Die magnetische Anisotropie verursacht die Zunahme der chemischen Verschiebung der Protonen 6 und 9 der Verbindungen 1, 2, 6, 7 und 8 gegenüber den Protonen 7 und 8 und 8

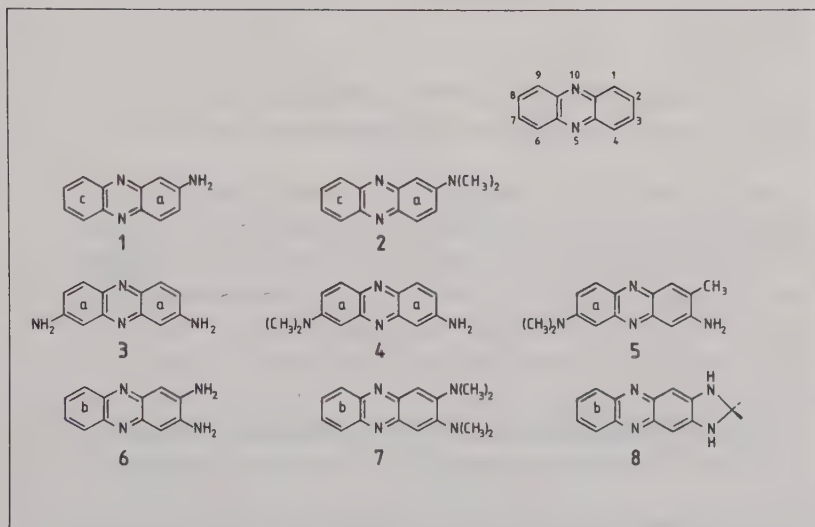


ABBILDUNG 18

Die Spinsysteme der Verbindungen 1 - 8.

2-Aminophenazin 1 und 2-Dimethylaminophenazin 2.

Ring a: Das experimentelle Spektrum zeigt ein AMX-System. H^1 liegt bei tiefem Feld, H^2 folgt bei höherem Feld und H^4 erscheint bei höchstem Feld. Dies korreliert mit der berechneten π -Elektronendichte im Grundzustand, die an Position 1 einen Wert von 0,977, an Position 2 einen Wert von 1,057 und an Position 4 einen

Wert von 1,140 hat. Ring b: Die Protonen 7 und 8 müßten, gemessen an der π -Elektronendichte der Kohlenstoffatome 7 und 8, zwischen H^1 und H^2 erscheinen - dies ist tatsächlich der Fall. Bei H^6 und H^9 spielt die oben diskutierte magnetische Anisotropie eine Rolle - sie erscheinen bei tiefstem Feld (vgl. Abb. 19 und 23).

3,7-Diaminophenazin 3, 3-Amino-7-dimethylaminophenazin 4 und 2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin 5.

Ring a: Auch hier tritt ein Spektrum 1. Ordnung vom Typ AMX auf. H^1 erscheint bei tiefem Feld, H^2 folgt bei höherem Feld, und H^4 zeigt ein Dublett bei höchstem Feld. Diese Abstufung korreliert mit den berechneten π -Elektronendichten im Grundzustand. C-1: 0,974, C-2: 1,069 und C-4: 1,141 (vgl. Abb. 20 und 24).

2,3-Diaminophenazin 6, 2,3-Bis-(dimethylamino)-phenazin 7 und 2,2 -Dimethyl-1,3-diazolin-(b)-phenazin 8.

Ring a: Die Signale der Protonen H^1 (bzw. H^4) werden bei höchstem Feld beobachtet. In Übereinstimmung damit berechnet man für die entsprechenden Kohlenstoffatome die höchsten π -Elektronendichten (1,117).

Ring b: Hier liegt ein Spektrum vom Typ AA'BB' vor. Alle Signale erscheinen gegenüber $H^{1,4}$ bei tieferem Feld. Die berechneten π -Elektronendichten sind an den Positionen C-6/9 und C-7/8 kleiner als an C-1/4. Bei H^6 und H^9 spielt die oben diskutierte magnetische Anisotropie eine Rolle - sie erscheinen bei tiefstem Feld (vgl. Abb. 21 und 25).

5. EINSATZ DER FARBSTOFFE IN DER HISTOLOGISCHEN FÄRBUNG

5.1 Wichtige Gesichtspunkte der Färbung

Zellen kann man sich vereinfacht aus Zelleib und Zellkern bestehend vorstellen /42/. Beide bilden eine Funktionseinheit. Dabei besteht der Zelleib vorwiegend aus Cytoplasma, das außerdem noch Produkte des Stoffwechsels enthält, und aus Zellorganellen.

Im Zellkern befinden sich Nukleinsäuren (DNA, und in den abgeteilten Kernkörperchen RNA), die vom Kernplasma umgeben sind. Kernplasma und Cytoplasma bestehen beide vorwiegend aus Proteinen.

Färbt man solche Systeme mit Farbstoffen, so hat man eine Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen und obigen Biopolymeren vorliegen. Bei Verwendung kationischer Farbstoffe werden bei $\text{pH} < 4,5$ vorwiegend Kernstrukturen angefärbt /43/. Bei dieser Färbung kann man grundsätzlich zwischen folgenden wichtigsten Bindungstypen /3/ unterscheiden: a) Coulombwechselwirkung, d.h. Jon-Ion- und Ion - Dipol-Wechselwirkung. Diese sind im Fall der Phenazinfarbstoffe stark abhängig vom pH-Wert der Umgebung, vom pK_s -Wert der Farbstoffe und von der Ionenstärke (Elektrolytzusatz der Färbelösung). b) Wasserstoffbrückenbildung - man hat Protonen Donator-Acceptor-Systeme vorliegen, wobei der Farbstoff der Protonen-Donator ist. c) Intercalation - hier nimmt im Gegensatz zur ionischen Bindung die Entropie ab.

Es bieten sich folgende Nachweismöglichkeiten des Bindungstyps an: Man untersucht die pH-Abhängigkeit /44/ der Färbung, um zwischen verschiedenen negativ

geladenen Zentren zu unterscheiden. Weiterhin kann man die Ionenstärke der Färbelösung variieren, um zwischen Coulombwechselwirkung und Wasserstoff-Brückenbindung zu differenzieren. Da die Farbstoffe bei der Färbung je nach Beeinflussung selektiv mit den Zellstrukturen reagieren, können sich auch ihre optischen Eigenschaften, wie Lage und Form der Absorptionsbanden im UV und somit auch der Fluoreszenzbande ändern. Daher ist es wichtig, das Verhalten der Elektronenzustände bei Störungen (z.B. verschiedenartige Substitutionen) zu kennen.

5.2 Ergebnisse der Färbung

Im vorliegenden Versuch wurde mit Neutralrot* 5 als Vertreter der Phenazinreihe gefärbt. Gearbeitet wurde mit Formalinfixierten Dickdarmpräparaten vom Kaninchen, die nach gängigen /45/ histologischen Methoden für die Färbung vorbereitet wurden. Es wurde in 1% iger ethanölicher Lösung mit 10^{-3} molarer Farbstoffkonzentration gefärbt.

Wie vermutet, färbt die neutrale Farbstofflösung (pH der Lösung ~ 7) die Schnitte nicht an. Die Färbereihe wurde abgebrochen.

Das kationische Molekül, das im sauren Bereich (pH 4,5) existiert, weist durch seine Ladung eine Affinität zu den Kernbestandteilen auf. Nach dreißigminütiger Färbzeit sind im Dickdarmpräparat die Zellkerne gut dargestellt. Die Plasmafärbung ist sehr dezent; die Zellmembran ist nicht immer deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 26).

* Für das Neutralrot sind uns aus dem Schrifttum keine histologischen Färbedaten bekannt. Es wird bislang als Vitalfarbstoff benutzt.

Bei 10^{-2} molarer NaCl-Färbelösung ist eine zunehmende Kontrastierung noch nicht eindeutig in allen Präparatabschnitten erkennbar.

Es wurde eine weitere Färbereihe mit $MgCl_2$ durchgeführt. Magnesium erbrachte, als zweifach positiv geladenes Ion, eine eindeutigere Kontrastverstärkung als Natrium. Das Cytoplasma nimmt bei Salzzugabe weit mehr Farbstoff auf, als bei der reinen Neutralrotfärbung (vgl. Abb. 27).

Im Gegensatz zum Thionin (Phenthiazin-Gruppe) und zum Capriblau (Phenoxazin-Gruppe) (vgl. Abb. 28) ist bei Neutralrot (Phenazin-Derivat), nach Salzzugabe, eine Intensivierung des Färbeeindrucks zu beobachten. Außerdem ist bei den Phenthiazin- und Phenoxazin-Derivaten ein gegenteiliger Effekt bei Elektrolytzugabe zu beobachten. Sowohl bei NaCl-, als auch $MgCl_2$ -Zugabe zur Farbstofflösung entfärben die Präparate nahezu vollständig. Dabei wurden gleiche Färbebedingungen wie bei Neutralrot zugrundegelegt.

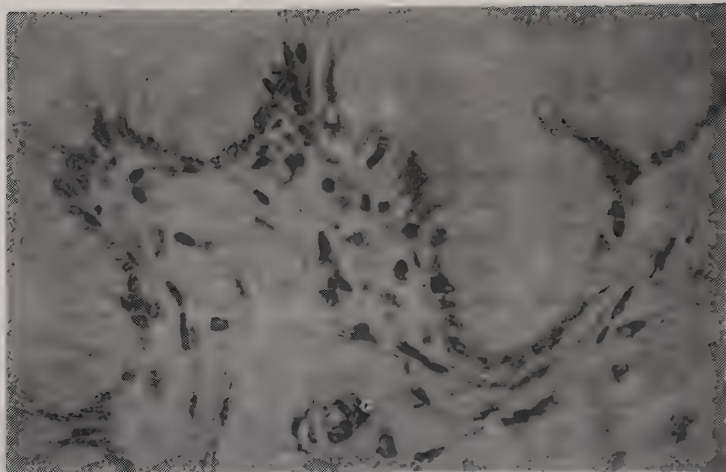


ABBILDUNG 26
Neutralrot, Dickdarm (Kaninchen), Färbezeit 30 min.,
Erläuterungen im Text.

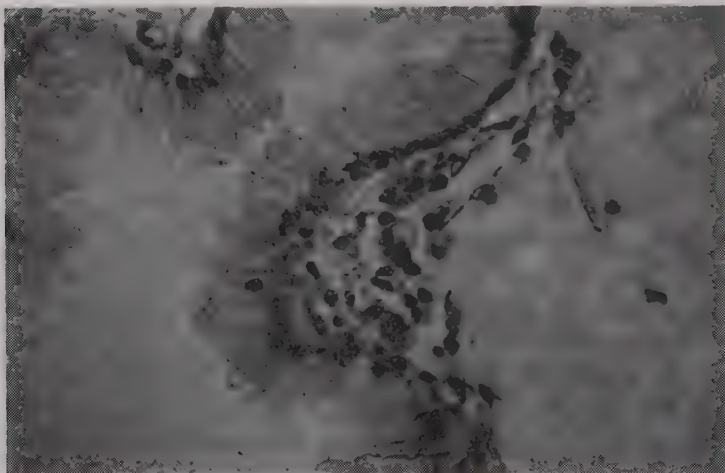


ABBILDUNG 27
Neutralrot + $MgCl_2$ (10^{-2} Mol/l), Färbezeit 30 min.,
Erläuterungen im Text.

5.3

Diskussion der Ergebnisse

Wie vorher beschrieben reagieren Thionin und Capri-blau (auch Oxonin) gegenüber Elektrolytzugabe anders als Neutralrot. Diese drastischen Unterschiede könnten in der Fähigkeit Wasserstoff-Brücken zu bilden begründet sein. Wie in Kap. 4.1.2.2 beschrieben, werden die Amino-phenazine zuerst am Stickstoff-5 protoniert. Hier kann das Molekül auch Wasserstoff-Brücken ausbilden. Bei Oxonin und Thionin kann eine solche Struktur, bei verwendetem pH, aufgrund des pK_s -Wertes (< 1) der ersten Protonierung, ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 28).

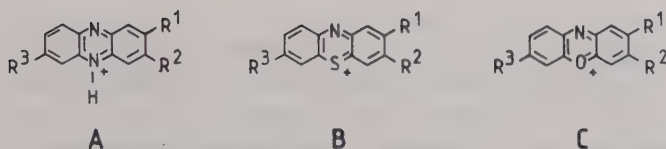
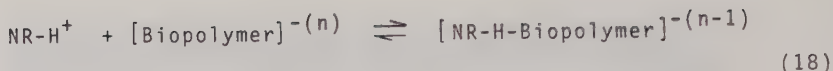


ABBILDUNG 28

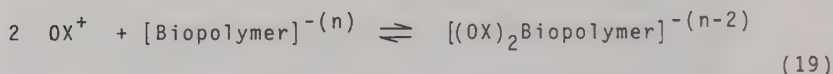
A Phenazin-, B Phenthiazin-, C Phenoxazinfarbstoffe

Damit können folgende zwei unterschiedliche Gleichgewichte bei der Färbung formuliert werden:

Phenazinreihe (Bsp. Neutralrot = NR): Man hat neben Coulombwechselwirkung noch Wasserstoffbrücken-bindung vorliegen.



Phenoxazin- bzw. Phenthiazinreihe (= OX). Hier können keine Wasserstoffbrücken gebildet werden (vgl. Gl. 19)



Mit obigem Modell kann die Entfärbung der Präparate (Oxonin/Thionin gegenüber Neutralrot) befriedigend erklärt werden. Um quantitative Aussagen zur Farbstoffaufnahme machen zu können, sind weitere Messungen nötig. Assoziationen /46/, die die geladenen Farbstoffmoleküle in wässriger Umgebung eingehen, könnten bei der Farbstoffaufnahme eine wichtige Rolle spielen.

Schlußfolgerung: Es zeigt sich hier, wie wichtig es ist, die Eigenschaften der Farbstoffe, wie z.B. pK_s -Wert, Ort der Protonierung, Ladungsdichten usw., genau zu kennen. Weiterhin geht aus den Ergebnissen hervor, daß bei Verunreinigung der Farbstofflösung (oder der Farbstoffe selbst) durch Salze, die Reproduzierbarkeit der Färbung stark leiden kann. Dies ist für eine in neuester Zeit angestrebte Automatisierung

von breitangelegten Reihenuntersuchungen zur Früherkennung maligner Veränderung der Gewebe von Bedeutung. Eine Standardisierung der Färbemethoden und der Farbstoffe erscheint unerlässlich.

6. EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Verwendete Geräte und Lösungsmittel

Zu den Elektronenspektren in Kapitel 3.2 und 6.5

Die Absorptions-, Fluoreszenz- und Fluoreszenz-anisotropiespektren wurden in einer Ethanolmatrix bei 77 K aufgenommen (Uvasol/Merck). Die Absorptionsmessungen wurden mit dem Zeiss Spektralphotometer PMQ II durchgeführt. Der experimentelle Aufbau für die Fluoreszenz- und Anisotropiemessungen, unter Verwendung eines rotierenden Polarisators, ist prinzipiell schon an anderer Stelle beschrieben /9,47/. Es wurden hier zwei 0,6 m Czerny-Turner Monochromatoren von Jobin-Yvon mit einem holographischen 1220 Strich/mm Gitter im Anregungsmonochromator benutzt. Die lineare Dispersion liegt im untersuchten Wellenlängenbereich zwischen 12 - 13,4 Å/mm. Die Auflösung war im ungünstigsten Fall besser als 2 nm. Die Phasenverschiebung wurde analog mit einem 393 Lock-In Analyzer von Ithaco gemessen. Als Lichtquelle wurde eine 300 Watt Xenon-Hochdrucklampe von Garching Instrumente benutzt; der verwendete Multiplier R 372 war von Hamamatsu. Die Spektren sind auf Streu- und Falschlicht korrigiert.

Zu den Lösungsmittelspektren in Kapitel 3.5

Die Lösungsmittelspektren wurden mit einem registrierenden Spektralphotometer DMR 22 der Firma Carl Zeiss /Oberkochen durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden Uvasole der Firma Merck verwendet. Es wurde jeweils auf 25⁰ C thermostatisiert (298,15 K).

Zu den pK_s -Werten in Kapitel 4.1

Die pH- und UV-Messungen erfolgten alle bei 25° C (298,15 K). Die pH-Messungen wurden mit einem Digital-pH-Meter 645 der Firma Knick durchgeführt. Das pH-Meter wurde vor der Messung mit frisch angesetzten Eichlösungen vom pH 4 und 7 geeicht. Glaselektrode: pH-Einstabmeßkette N 61 der Firma Schott/Mainz, Ableitung Thalamid^R, Nullpunkt pH 7, Platindiaphragma. Die UV-Messungen wurden mit einem registrierenden Spektralphotometer DMR 22 der Firma Carl Zeiss/Oberkochen durchgeführt.

Pufferlösungen:

pH 1,00: Glycokoll/HCl (Merck-Titrisol)

pH 1,1 - 4,9: Natriumcitrat/HCl nach S.P.L. Sörensen

pH 5,0 - 6,6: Natriumcitrat/NaOH nach S.P.L. Sörensen

pH 5,0 - 7,9: KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 nach S.P.L. Sörensen

pH 8,00: Borat/HCl (Merck-Titrisol)

pH 9,00: Borsäure/KCl-NaOH (Merck-Titrisol)

Die Eichlösungen lieferte ebenfalls die Firma Merck.

Die ethanolischen Pufferlösungen:

0,1 ml der ethanolischen Stammlösung wurde jeweils mit 10 ml Puffer vermischt, so daß die Konzentration an Farbstoff $\sim 10^{-5}$ Mol/l betrug.

Die angegebenen Fehlergrenzen in Tabelle 8 sind Standardabweichungen der Messung.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \bar{x} \sum x_i}{n - 1}}$$

$\bar{x}$ = Arithmetisches Mittel, x_i = Meßwert, n = Anzahl der gemessenen Werte (meist 8 - 9 Werte).

Zu den Protonenresonanz-Spektren in Kapitel 4.2

Alle Protonenresonanz-Spektren wurden auf einem Fourier-Kernresonanz-Spektrometer WH 270 der Firma Bruker-Physik aufgenommen. Interner Standard: TMS. Lösungsmittel: DMSO-d⁶, Aceton-d⁶ und CDCl₃. Frau Brauer und Frau Dreke, Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin FB 21, Wissenschaftliche Einheit WE 2, danke ich für die Aufnahme der Kernresonanz-Spektren.

Infrarot-Spektren: Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer 257 Gitterspektrometer gemessen. 8 wurde mit einem Perkin-Elmer 580 B Gitterspektrometer gemessen. Sämtliche Proben wurden als KBr-Preßlinge aufgenommen.

Frau Erdmann, FB 21 der FU Berlin danke ich für die Aufnahme des Spektrums von 8.

Massenspektren: Alle Massenspektren wurden mit einem Varian MAT 112 S aufgenommen. Ionisierungsenergie 80 eV. Frau Oswald, Frau Merten und Frau Franke, FB 21, WE 2 der FU Berlin, danke ich für die Aufnahme der Spektren.

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunkt-Bestimmungsgerät 510 der Firma Büchi Laboratoriums-Technik AG/Schweiz durchgeführt. Alle Werte sind unkorrigiert.

Die Elementaranalysen wurden von Frau Gaby Witzmann, FB 21 der FU Berlin und in der Analytischen Abteilung des Makromolekularen Instituts der Universität Freiburg durchgeführt.

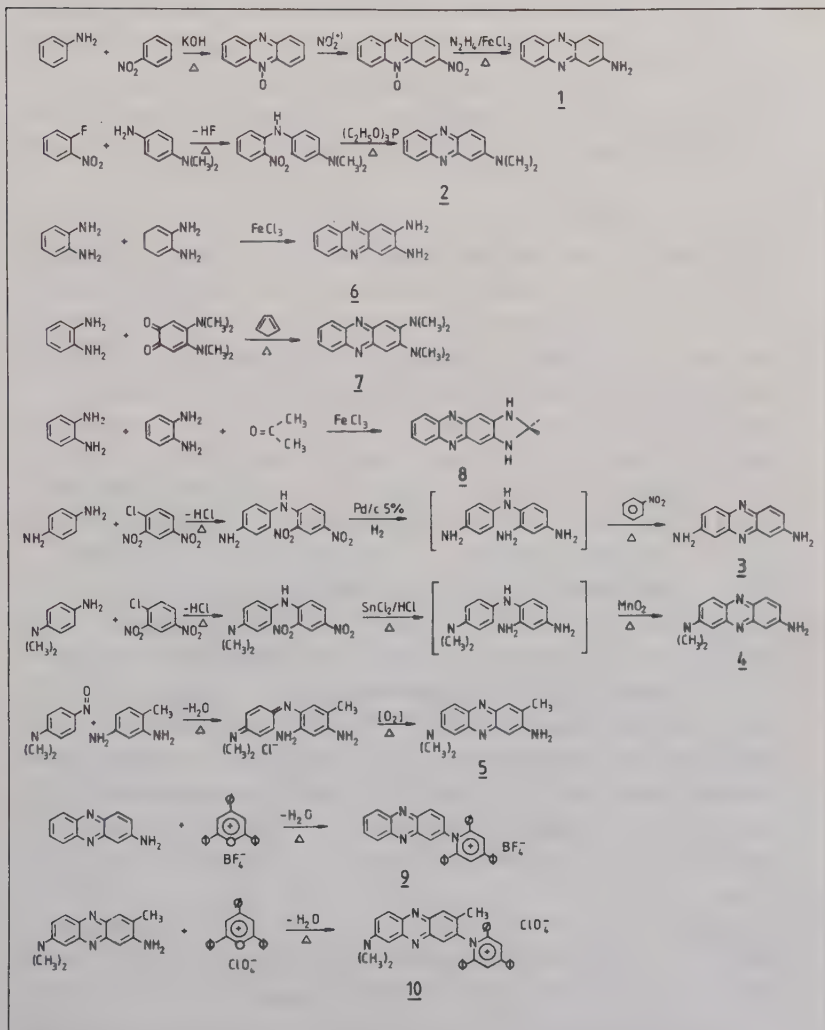
6.2 Darstellung und Charakterisierung der Aminophenazine

ABBILDUNG 29

Übersicht über die Synthesewege zu den Verbindungen 1 - 10 .

Arbeitsvorschriften:2-Aminophenazin 1

1 wurde nach modifizierten Literaturvorschriften
bereitet. Phenazin-N-oxid /48/ wurde unter milden Be-
dingungen nitriert /49/ und das entstandene 2-Nitro-
phenazin-N-oxid mit Hydrazinhydrat /50/ reduziert.

Phenazin-N-oxid

80 g gepulvertes KOH, 31 g Nitrobenzol und 25 g Anilin
werden in 350 ml Toluol 7 h unter Rückfluß (110°C) ge-
kocht. Der entstandene Niederschlag wird über eine
Nutsche abfiltriert und mit heißem Toluol (2,5l) aus-
gewaschen. Das abgekühlte Filtrat wird mit halbkon-
zentrierter HCl ausgeschüttelt. Die salzsaure Lösung
versetzt man daraufhin so lange mit konz. NH_3 , bis ein
gelboranger Niederschlag ausgefallen und ein pH-Wert
von ~ 8 erreicht ist. Der Niederschlag wird abgenutscht
und bis zum Neutralpunkt (pH-Papier $\sim \text{pH } 7$) gewaschen.
Die Kontrolle mittels Dünnschicht-Chromatographie
(Al_2O_3 neutral, Toluol 6, CHCl_3 5, EtOH 1) ergibt
drei Zonen. Die mittlere orange Zone entspricht dem
N-Oxid. Es wird säulenchromatographisch (Al_2O_3 ,
Aktivität 3, Toluol 6, CHCl_3 , EtOH 1) gereinigt. Bei
vorsichtigem Einrotieren des Eluats fallen lange gelb-
orange Nadeln aus. Es wird 12 h unter Hochvakuum HV
bei 80°C getrocknet.

Ausbeute: 3 g

Schmp.: 222°C

$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ (196,21 g/mol)

Ber.: C 73,46% H 4,12% N 14,25%

Gef.: C 74,03% H 4,21% N 14,48%

2-Nitrophenazin-N-oxid

3g Phenazin-N-oxid werden in 7,5 ml konz. H_2SO_4 gelöst und auf -10°C herabgekühlt. Zur Lösung gibt man unter ständigem Kühlen tropfenweise eine Mischung aus 30 ml konz. H_2SO_4 und 1,6 g KNO_3 . Die Reaktionstemperatur soll 1°C nicht übersteigen. Mit Beendigung des Zutropfens wird noch 3 h gerührt ($t \leq 5^\circ\text{C}$). Die ölige dunkelrote Lösung wird in ein Wasser/Eis-Gemisch geschüttet - es fällt ein gelboranger Niederschlag aus. Dieser wird abgenutscht und so lange mit Wasser gewaschen, bis keine Säure mehr nachzuweisen ist (pH-Papier). Es wird 12 h unter HV bei 80°C getrocknet.

Ausbeute: 2,5 g

Schmp.: 170°C

$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3$ (241,21 g/mol)

Ber.: C 59,75% H 2,93% N 17,41%

Gef.: C 59,59% H 2,87% N 17,34%

2-Aminophenazin 1

2,5 g 2-Nitrophenazin-N-oxid, 0,2 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 2 g Aktivkohle werden 10 min. in 300 ml Methanol unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen des Gemisches wird 1,2 ml Hydrazinhydrat zugetropft und anschließend 5 h unter Rückfluß erhitzt (DC-Kontrolle, Al_2O_3 neutral, Toluol 6, CHCl_3 5, EtOH 1). Die Lösung wird mehrmals heiß filtriert, um den Kohlenstoff zu entfernen und anschließend einrotiert. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (Al_2O_3 , Aktivität 3, Toluol 6, CHCl_3 5, EtOH 1). Von den drei Fraktionen wird die gelborange einrotiert und aus Methylenchlorid/n-Heptan umgefällt.

Ausbeute: 0,4 g

Schmp.: 286°C ($265 \leftrightarrow 291^\circ\text{C}$,/62/)

$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3$ (195,23 g/mol)

Ber.: C 73,83% H 4,66% N 21,53%

Gef.: C 72,13% H 4,58% N 21,02%

2-Dimethylaminophenazin 2

2-Nitro-4'-N,N-dimethyldiphenylamin

3,4 g p-N,N-dimethylphenylendiamin , 3,52 g 2-Nitro-fluorbenzol und 3,8 g Na_2CO_3 werden in 150 ml Amyl-alkohol 7 h unter Rückfluß erhitzt (unter N_2). Es wird heiß abgenutscht und das Filtrat über Nacht ins Gefrierfach gestellt. Es wird erneut abgenutscht und die Kristalle bei 80°C 8 h unter HV getrocknet. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (Al_2O_3 , Benzol) und durch Umkristallisieren in Cyclohexan. Ausbeute: 2,9 g Schmp.: 123°C

2-Dimethylaminophenazin 2

Es wurde nach einer allgemeinen Vorschrift von Cadogan /51/ verfahren.

720 mg 2-Nitro-4'-N,N-dimethylamino-diphenylamin und 3 g Phosphorigsäure-triäthylester werden in 22 ml Cumol unter Stickstoff 50 h zum Rückfluß erhitzt. Es wird unter Wasserstrahl-Vakuum abgedampft und dünn-schichtchromatographisch getrennt (Al_2O_3 , Benzol 3, CHCl_3 1). Anschließend wird aus Cyclohexan um-kristallisiert und bei Raumtemperatur unter HV ge-trocknet.

Ausbeute: 60 mg

Schmp.: 152°C ($155-156^\circ\text{C}$, /63/) $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3$ (223,28 g/mol)

Ber.: C 75,31% H 5,87% N 18,82%

Gef.: C 74,74% H 5,74% N 18,79%

2,3-Diaminophenazin 6

6 wurde nach einer modifizierten Literaturvorschrift von F. Ullmann und F. Mauthner bereitet /52,53/.

10,8 g o-Phenylendiamin werden fein zermörserst und in 600 ml Ether gelöst. Dazu gibt man 65 g FeCl_3 , gelöst in 1 l Ether. Die Lösung wird über Nacht stehen gelassen und abgenutscht. Der Niederschlag wird in 500 ml H_2O aufgenommen, die Suspension eine halbe Stunde gerührt und mit NH_3 leicht alkalisch gemacht. Zur jetzt grünen Suspension wird die gleiche Menge Ethanol zugegeben und anschließend abgenutscht. Den zurückbleibenden Niederschlag eluiert man mit 1 l heißem Ethanol. Zum gesammelten Filtrat gibt man 4 l Wasser. Die ausgefällten Kristalle werden abgenutscht und in Ethanol/Wasser 1:4 umkristallisiert (Man löst in heißem Ethanol bei etwa 70°C und gibt vorsichtig 4 l 70° warmes Wasser hinzu). Es wird 12 h über P_2O_5 getrocknet (Wasserstrahlvakuum).

Ausbeute: 1,42 g

Schmp.: $> 300^\circ\text{C}$

$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4$ (210,24 g/mol)

Ber.: C 68,56% H 4,79% N 26,65%

Gef.: C 68,09% H 4,81% N 26,48%

2,3-Bis-(dimethylamino)-phenazin 7

7 wurde durch Kondensation von 4,5-Bis-(dimethylamino)-o-chinon /54/ und o-Phenylendiamin synthetisiert.

200 mg 4,5-Bis-(dimethylamino)-o-chinon werden mit 5 ml frisch destiliertem Cyclopentadien 30 min. auf dem Wasserbad erwärmt. Anschließend wird das Cyclopentadien abgezogen, der Rückstand in 8 ml CHCl_3 gelöst und 150 mg o-Phenylendiamin zugegeben. Es wird 15 min. unter Rückfluß erhitzt. Das CHCl_3 wird wieder abgezogen.

Anschließend wird im Metallbad 30 min. unter Wasserstrahlvakuum auf 150 - 165°C erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird säulenchromatographisch (Al_2O_3 , Benzol 1, CH_2Cl_2 1) gereinigt. Es wird im Petroläther umkristallisiert und bei Raumtemperatur unter HV getrocknet.

Ausbeute: 110 mg

Schmp.: 118 - 120°C (120°C, Zers.,/64/)

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4$ (266,35 g/mol)

Ber.: C 72,15% H 6,81% N 21,04%

Gef.: C 71,00% H 7,72% N 18,98%

2,2-Dimethyl-1,3-diazolin-(b)-phenazin 8

8 wurde durch Kondensation von Aceton mit o-Phenylendiamin bereitet. 10,8 g o-Phenylendiamin gelöst in 600 ml Ether, 5,8 g (7,35 ml) Aceton und 65 g FeCl_3 , gelöst in 1000 ml Ether werden bei Raumtemperatur zusammengegeben und 12 h stehen gelassen (Reihenfolge beachten). Der Niederschlag wird abgenutscht, in 500 ml Wasser (bei 30°C) unter Rühren aufgenommen und mit NH_3 alkalisch gemacht. Zu dieser Lösung wird 500 ml Ethanol zugegeben. Nach dreistündigem Rühren wird wieder abgenutscht. Aus dem Filtrat fallen nach einiger Zeit schöne orangefarbige Kristalle aus. Diese werden bei 100°C 8 h unter HV getrocknet.

Ausbeute: 1,76 g

Schmp.: > 300°C

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4$ (250,31 g/mol)

Ber.: C 71,98% H 5,64% N 22,38%

Gef.: C 69,81% H 5,70% N 22,10%

3,7-Diaminophenazin 3

3 wurde durch oxitative Cyclisierung nach Holliman /55/ dargestellt. 4-Amino-2',4'-dinitrodiphenylamin /56/ wurde katalytisch (Pd/C5%, 70 atm H₂, Reaktionsdauer 8 h, 20°C, in Ethanol) reduziert. Der Ringschluß erfolgte durch Kochen unter Rückfluß in Nitrobenzol /55/. Es wurde säulenchromatographisch (Al₂O₃, Aktivität 4, CHCl₃ 1, Benzol 1) und anschließendes Umkristallisieren in heißem salzsaurem Wasser, das mit NH₃ neutralisiert wurde, gereinigt. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur: 12 h, unter HV.

Ausbeute: 10% d. theoret. ber. Menge

Schmp.: 287°C (Zers.) (284°C, /59/)

C₁₂H₁₀N₄ (210,24 g/mol)

Ber.: C 68,56% H 4,79% N 26,65%

Gef.: C 68,31% H 4,65% N 26,21%

3-Amino-7-dimethylaminophenazin 4

4 wurde nach Nietzki hergestellt /56/. 4-Dimethylamino-2',4'-dinitrodiphenylamin /56,57/ wurde mittels SnCl₂/HCl reduziert. Die Cyclisierung erfolgte durch Kochen unter Rückfluß mit MnO₂. Es wurde in EtOH/H₂O 1:1 umkristallisiert und bei 80°C unter HV getrocknet.

Ausbeute: 9% d. theoret. ber. Menge

Schmp.: 256°C (Zers.) (252°C, /59/)

C₁₄H₁₄N₄ (238,29 g/mol)

Ber.: C 70,57% H 5,92% N 23,51%

Gef.: C 69,53% H 5,74% N 24,02%

2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin, (Neutralrot) 5

5 wurde nach O. N. Witt bereitet /58,59,57/. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (SiO₂,

Toluol 6, CHCl_3 5, EtOH 1) und durch anschließendes Umkristallisieren in EtOH/ H_2O 1:1.

Ausbeute.: 25-30% d. theoret. ber. Menge

Schmp.: 280-282°C (Zers.) (280-282°C, /59/)

$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4$ (252,32 g/mol)

Ber.: C 71,40% H 6,39% N 22,20%

Gef.: C 71,74% H 6,54% N 22,48%

2-[(2,4,6-triphenyl)-pyridinium]-phenazin-tetrafluoroborat 9 und 2-Methyl-3-[(2,4,6-triphenyl)-pyridinium]-7-dimethylaminophenazin-perchlorat 10.

9 und 10 können nach folgender allgemeiner Vorschrift synthetisiert werden /60/. Äquimolare Mengen von 2-Amino-phenazin 1 bzw. Neutralrot 5 und des 2,4,6-Triphenyl-pyrylliums Salzes werden in wenig Isoamylalkohol mit einem Überschuß an Natriumacetat 10 h unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht im Kühlschrank abgekühlt und der anfallende Niederschlag abgenutscht und gereinigt. Die Reinigung erfolgt chromatographisch: 9 bleibt auf der Säule ($\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) zurück und wird mit Ethanol ausgewaschen. Bei vorsichtigem Einrotieren fallen weiße Kristalle aus.

10: (Al_2O_3 , Toluol 6, CHCl_3 5, EtOH 1), bei vorsichtigem Einrotieren fallen rotviolette Kristalle aus.

9: Ausbeute: 9% d. theoret. ber. Menge

Schmp.: 190°C

$\text{C}_{35}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{BF}_4$ (573,41 g/mol)

Von Verbindung 9 war keine befriedigende Elementaranalyse zu erlangen.

10: Ausbeute: 5% d. theoret. ber. Menge

Schmp.: 210°C

$\text{C}_{38}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{ClO}_4$ (643,15 g/mol)

Ber.: C 70,97% H 4,68% N 8,71%

Gef.: C 69,39% H 4,73% N 7,81%

Alle Phenazinderivate wurden dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft.

6.3 Die Infrarotspektren der Aminophenazine 1 - 8

Die IR-Spektren der Verbindungen 1 - 8 werden hier aufgeführt, um einen schnellen optischen Vergleich zu ermöglichen.

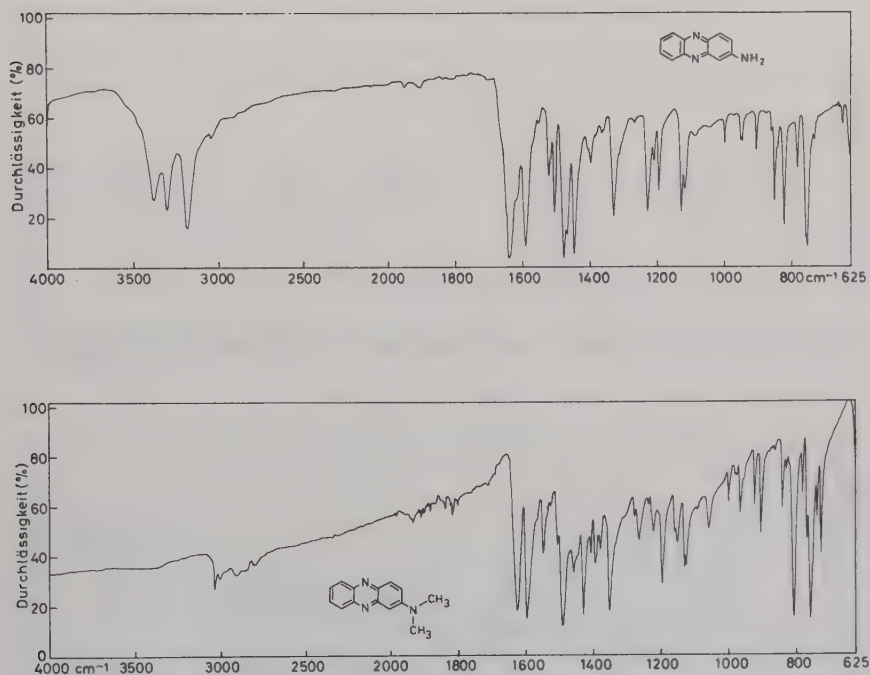


ABBILDUNG 30

Die IR-Spektren der Verbindungen 1 und 2
 2-Aminophenazin 1 und 2-Dimethylaminophenazin 2.

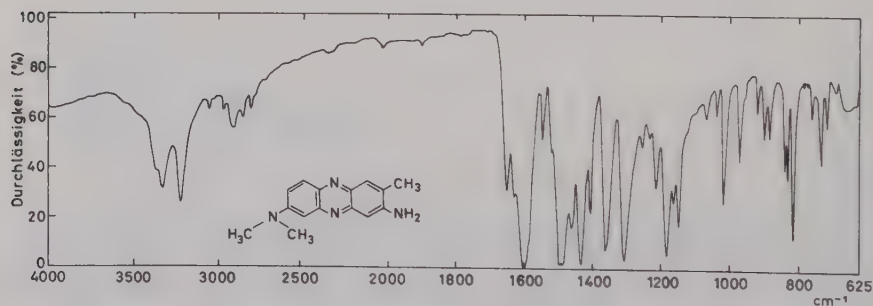
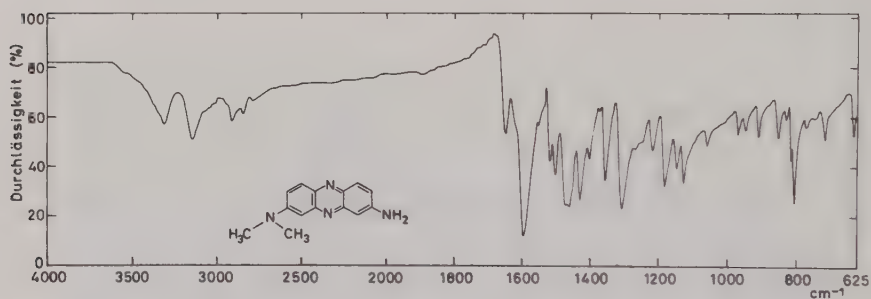
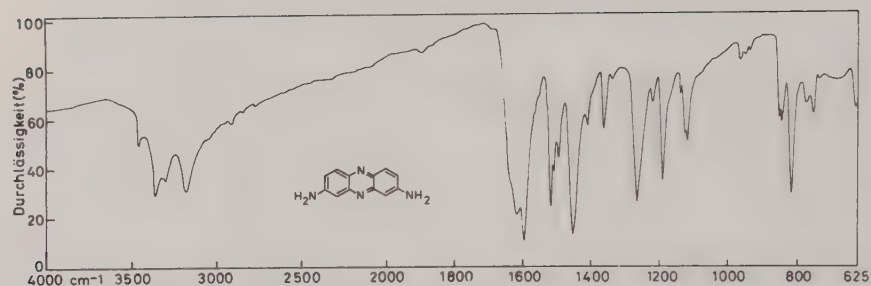


ABBILDUNG 31

Die IR-Spektren der Verbindungen 3 - 5

3,7-Diaminophenazin 3, 3-Amino-7-dimethylaminophenazin 4
und 2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin 5.

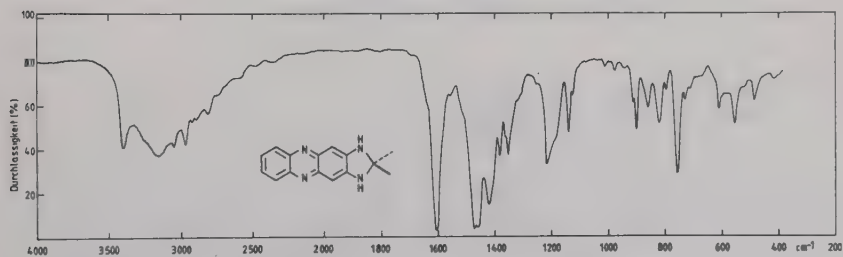
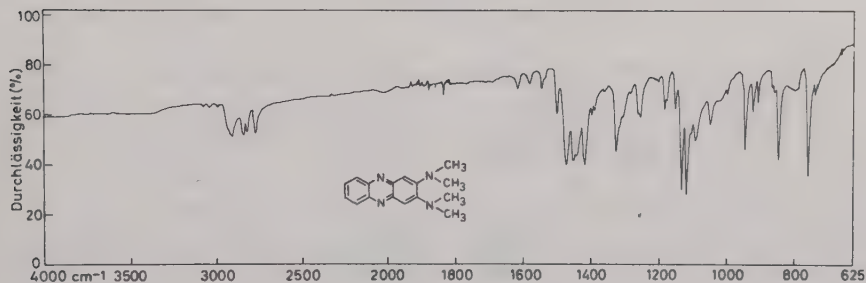
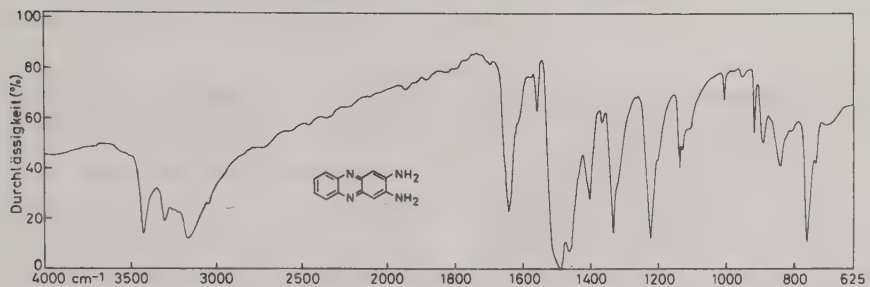


ABBILDUNG 32

Die IR-Spektren der Verbindungen 6 - 8

2,3-Diaminophenazin 6, 2,3-Bis-(dimethylamino)-phenazin 7
und 2,2-Dimethyl-1,3-diazolin-(b)-phenazin 8.

6.4 Die Massenspektren der Aminophenazine 1 - 10

Verbindung	t ^o C	M ⁺ (Int)	M ⁺⁺ (Int)	Charakteristische Fragmentationen (Int)
<u>1</u>	100 130	195 (100) (100)	97,5 (9) (9)	
<u>2</u>	60	223 (100)	111,5 (14)	
<u>3</u>	140	210 (100)	105 (17)	
<u>4</u>	160	238 (100)	119 (22)	
<u>5</u>	70 80	252 (100) (100)	126 (13) (10)	
<u>6</u>	40 120	210 (100) (100)	105 (30) (15)	
<u>7</u>	40 80	266 (100) (100)	133 (13) (16)	
<u>8</u>	130	250 (22)	125 (<1) vorhanden	135 = M ⁺ - CH ₃ (100)
<u>9</u>	150 250	486 (-) (6)	243 (-) (<1) vorhanden	307 =  (-) (100)
<u>10</u>	100/150 300	544 (-) (3)	272 (-) (-)	307 =  (-) (100)

Tabelle 13

Einige massenspektroskopische Daten zu den Verbindungen 1 - 10 .
M⁺ = Molekülion

Tabelle 13, Fortsetzung:

Alle Massenspektren wurden mit einem Massenspektrometer MAT 112 S von Varian aufgenommen. Ionisierungsenergie 80 eV, größte Intensität = (100). Ionen unter $m/e = 60$ werden nicht berücksichtigt /61/.

Aus Tabelle 13 sieht man, daß die Verbindungen 1 - 10 die erwarteten Molekülionpeaks liefern (vgl. Kap. 6.2).

1 = 2-Aminophenazin

2 = 2-Dimethylaminophenazin

3 = 3,7-Diaminophenazin

4 = 3-Amino-7-dimethylaminophenazin

5 = 2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin

6 = 2,3-Diaminophenazin

7 = 2,3-Bis-(dimethylamino)-phenazin

8 = 2,2-Dimethyl-1,3-diazolin-(b)-phenazin

9 = 2-[(2,4,6-triphenyl)-pyridinium]-phenazin-tetrafluoroborat

10 = 2-Methyl-3-[(2,4,6-triphenyl)-pyridinium]-7-dimethylaminophenazin-perchlorat

6.5 Die Elektronenspektren der Aminophenazine 1 - 8 und 10 bei 77 K

In den Abbildungen 33 - 41 ist der Polarisationsgrad mit P gekennzeichnet. Die Erregerwellenlänge für die Fluoreszenz und die Fluoreszenzpolarisation FP ist durch einen Pfeil und λ_A gekennzeichnet. In den Absorptions-Polarisationsgradspektren APF ist die festgehaltene Fluoreszenzwellenlänge durch den Indices F gekennzeichnet.

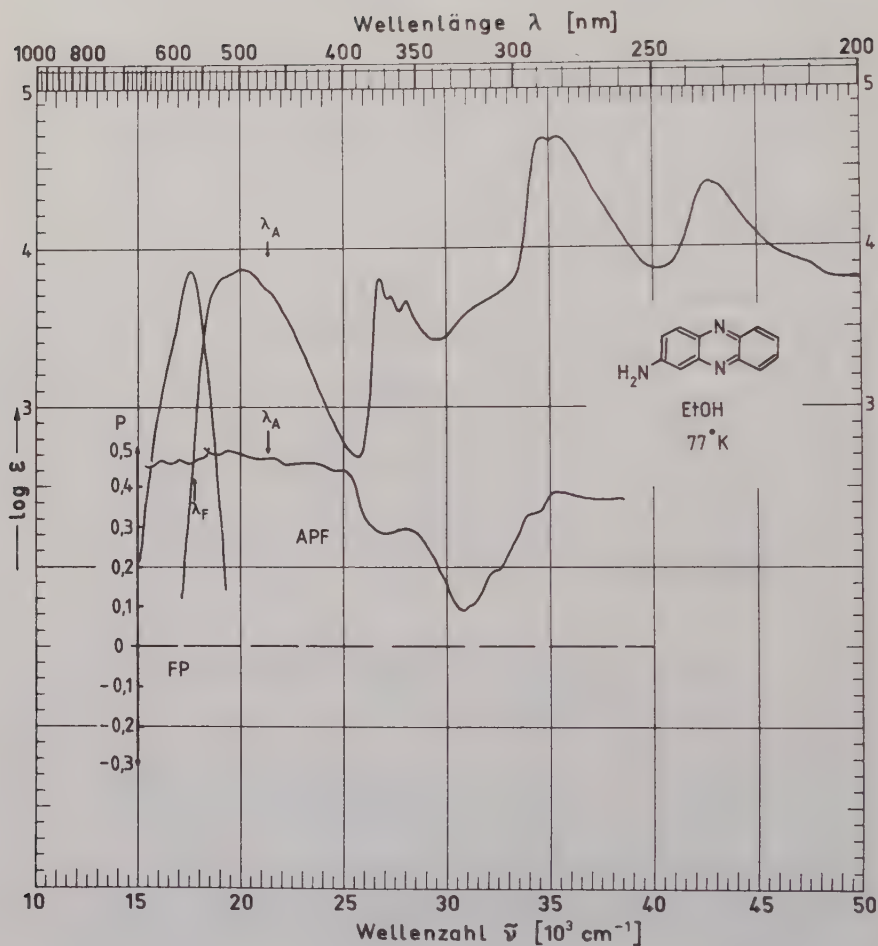


ABBILDUNG 33
Experimentelle Spektren von 2-Aminophenazin 1.

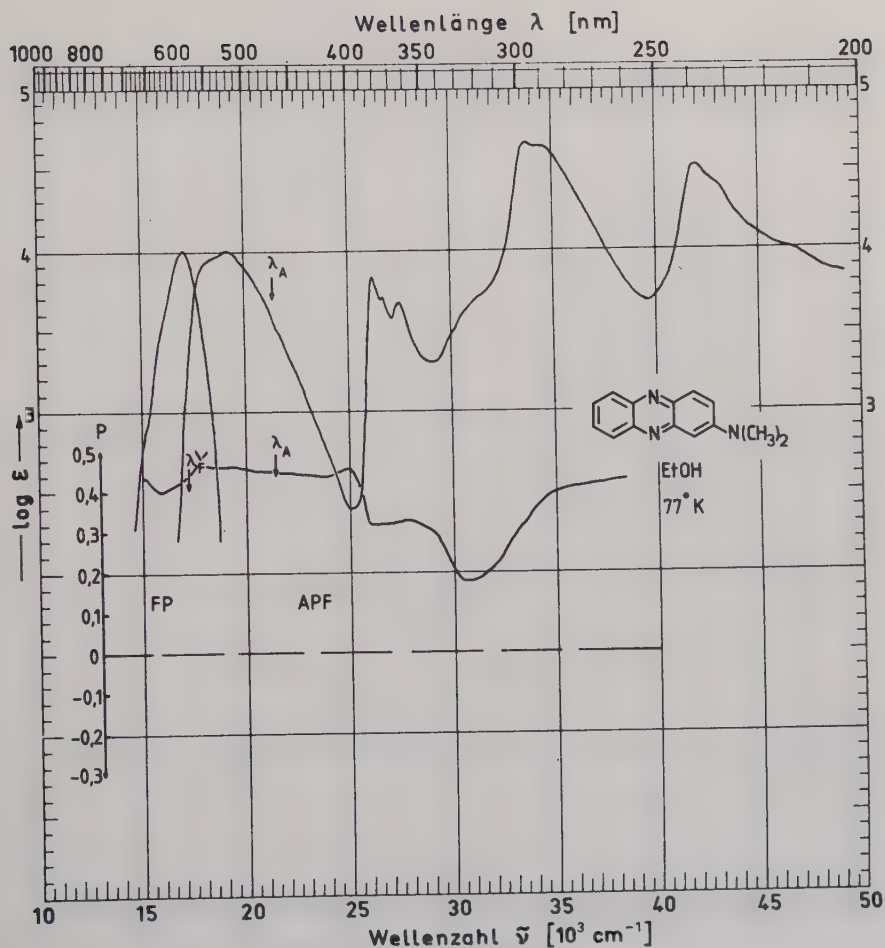


ABBILDUNG 34
Experimentelle Spektren von 2-Dimethylaminophenazin 2.

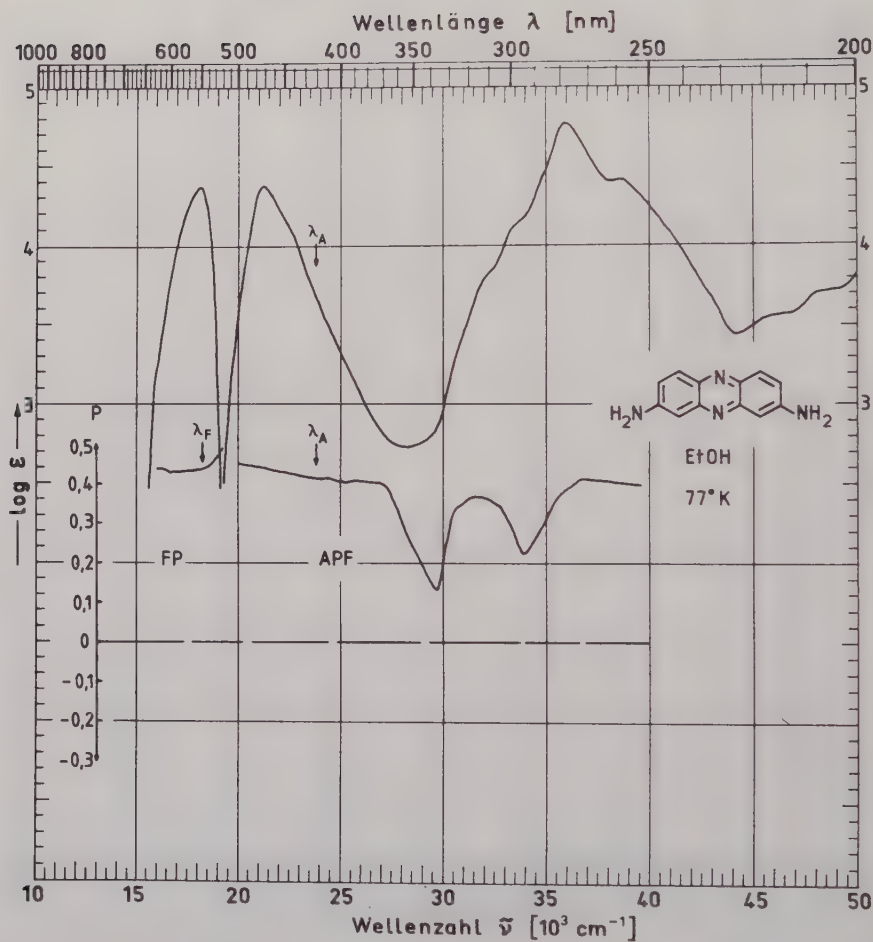


ABBILDUNG 35
 Experimentelle Spektren von 3,7-Diaminophenazin 3.

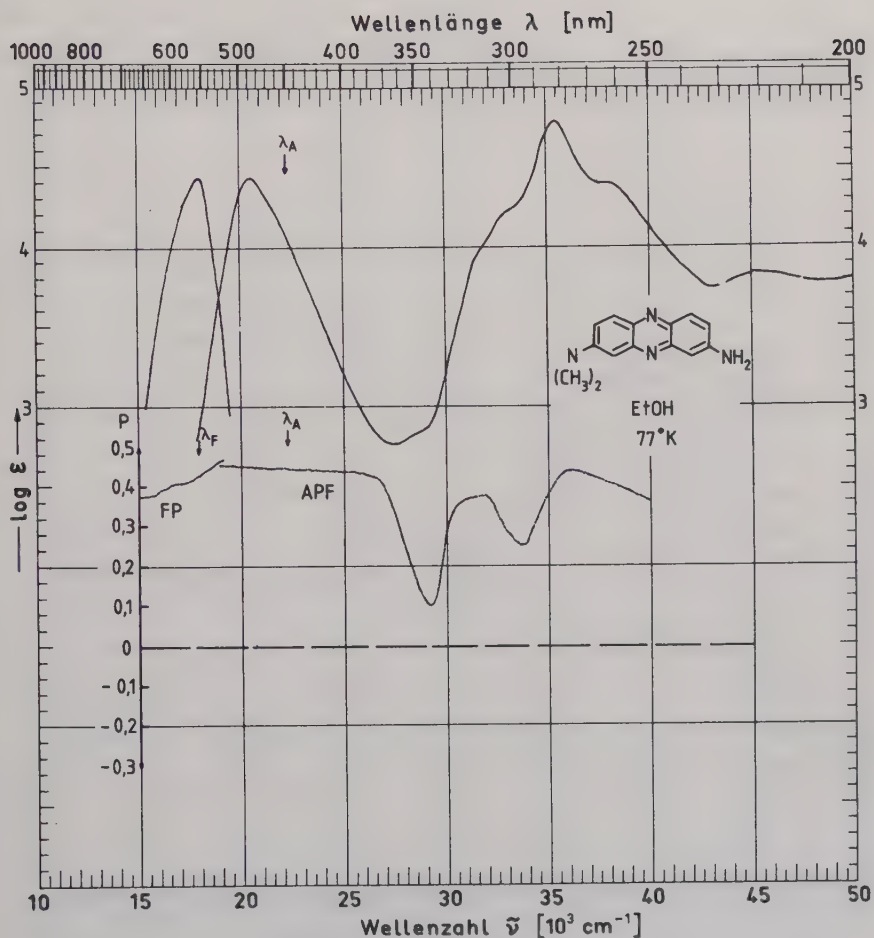


ABBILDUNG 36
Experimentelle Spektren von 3-Amino-7-dimethylamino-
phenazin 4.

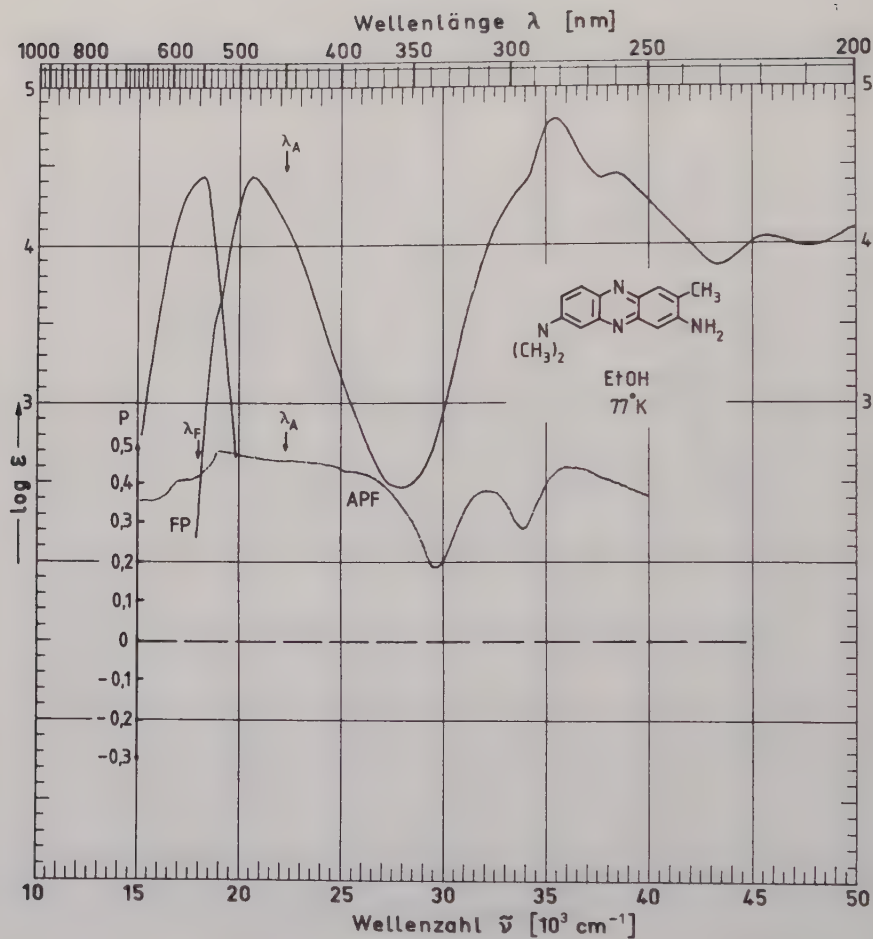


ABBILDUNG 37

Experimentelle Spektren von 2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin 5.

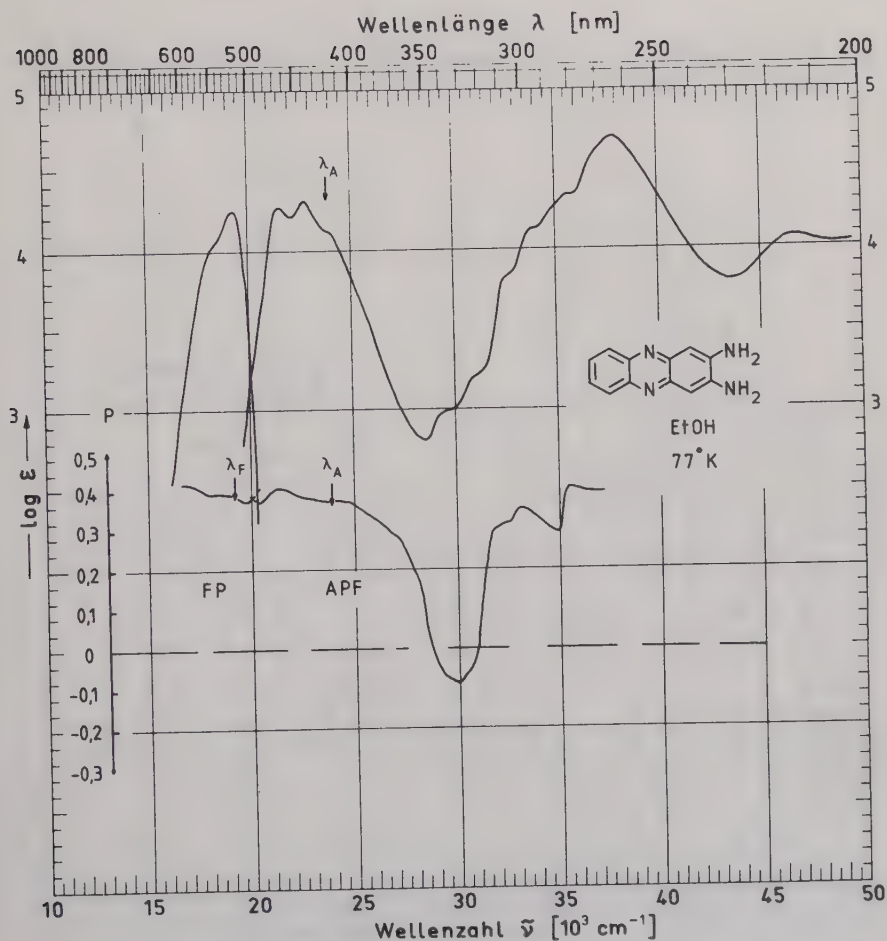


ABBILDUNG 38
Experimentelle Spektren von 2,3-Diaminophenazin 6.

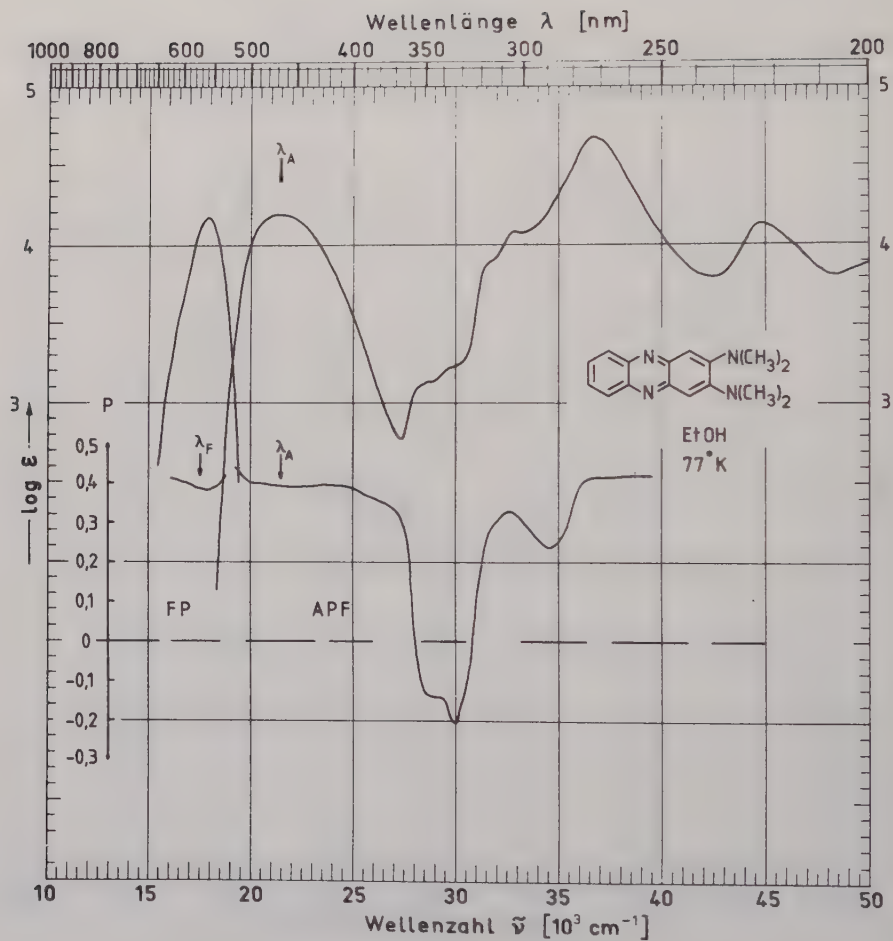


ABBILDUNG 39

Experimentelle Spektren von 2,3-Bis-(dimethylamino)-phenazin 7.

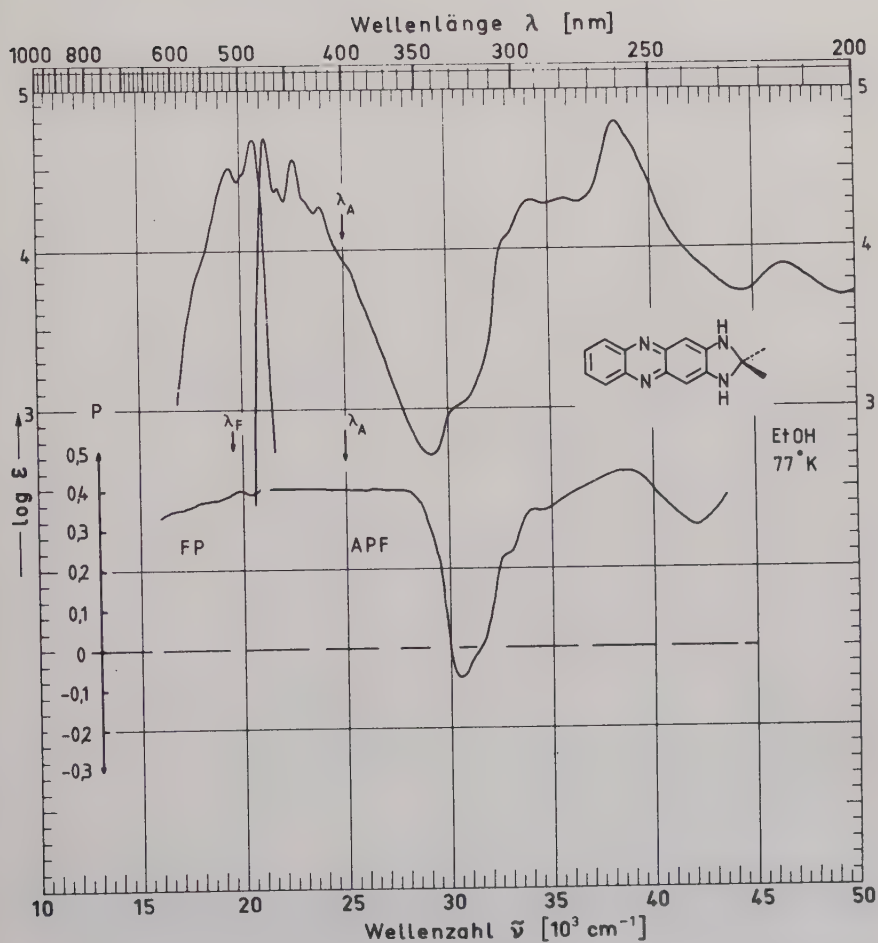


ABBILDUNG 40
Experimentelle Spektren von 2,2-Dimethyl-1,3-diazolin-(b)-phenazin 8.

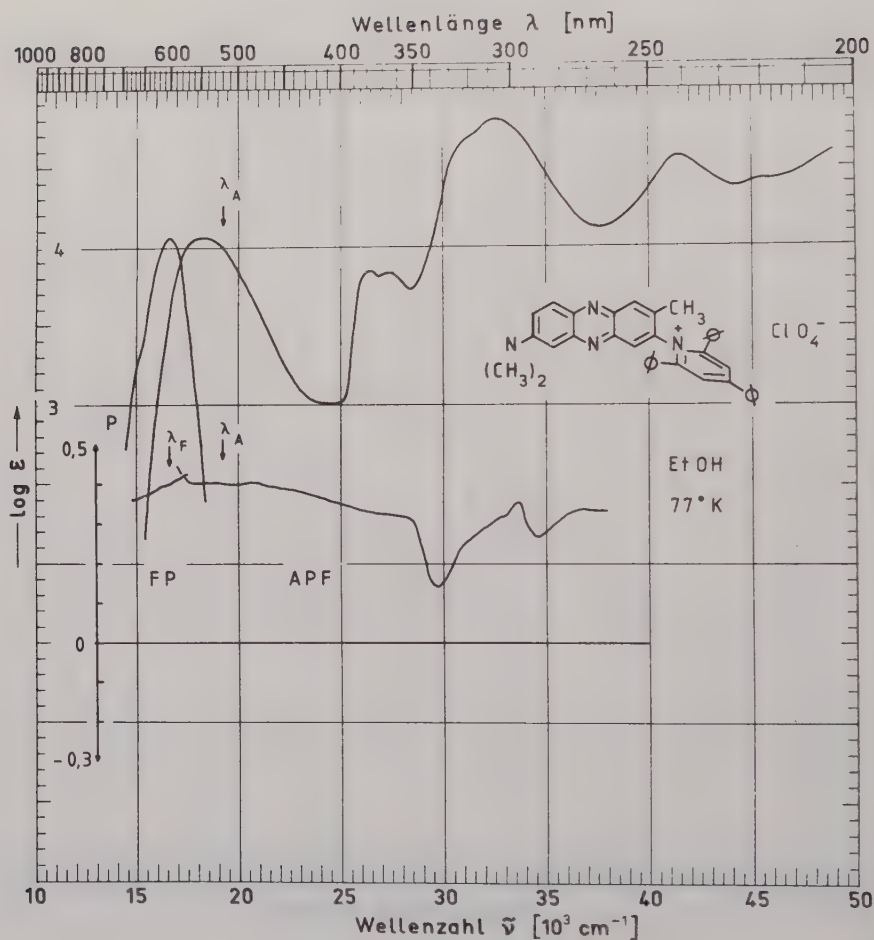


ABBILDUNG 41

Experimentelle Spektren von 2-Methyl-3-[(2,4,6-triphenyl)-pyridinium]-7-dimethylaminophenazin-perchlorat
10 .

Verbindung	Absorption (cm^{-1}) (lgE)			
<u>1</u>	21250 (3,90)	27500 (3,76)	36200 (4,71)	43400 (4,44)
<u>2</u>	20300 (4,01)	27200 (3,77)	35000 (4,73)	42600 (4,57)
<u>3</u>	22400 (4,37)		36700 (4,85)	47700 ^b (4,01)
<u>4</u>	21650 (4,40)		36000 (4,82)	47000 (4,09)
<u>5</u>	21700 (4,41)		35900 (4,84)	46800 (4,10)
<u>6</u>	23400 (4,28)		38400 (4,72)	47100 (4,12)
<u>7</u>	22450 (4,22)		37450 (4,67)	45300 (4,25)
<u>8</u>	21900 ^a (4,43)	34400 (4,34)	38700 (4,88)	46800 (4,00)

Tabelle 14

Spektroskopische Daten zu den Elektronenspektren der Verbindungen 1 - 8 (vgl. Abb. 33 -41), $t = 25^{\circ}\text{C}$ (298,15 K)
a Lage des 0-0-Übergangs, b Schulter.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Absorptions-, Fluoreszenz- und Polarisationspektren (A,F,APF,FP) von zehn Amino-derivaten des Phenazins untersucht, von denen ein Teil erstmalig hergestellt wurde.

Lage, Intensität und Polarisation der Elektronenübergänge werden unter Zuhilfenahme von PPP-D-CI-Rechnungen gedeutet.

Die Ladungsverteilung im Heteroaromaten, die sich für den Grundzustand der Moleküle aus den quantenchemischen Rechnungen ergibt, wird durch ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt.

Am Beispiel von Derivaten des 2,3-Diaminophenazins konnte der Einfluß der sterischen Anordnung der Substituenten auf die π -Elektronendichten in Heteroaromaten gezeigt werden.

Die pK_s -Werte der Phenazinderivate wurden bestimmt; sie liegen zwischen $3 < \text{pK}_s < 7$. Die Protonierung erfolgt am Stickstoff des Phenazingerüsts. Bei 3,7-substituierten Derivaten wird N-5 protoniert.

Es wurde untersucht unter welchen Bedingungen die Phenazinfarbstoffe, insbesondere Neutralrot, zur Färbung von fixierten Gewebeschnitten herangezogen werden können. Wie bei den analogen Färberversuchen mit Phenoxazin- bzw. Phenthiazinderivaten, werden Farbstoffkationen von den Zellkernen aufgenommen. Im Gegensatz zu den erstgenannten Farbstoffkationen, werden Neutralrotpräparate (als Vertreter der Phenazinreihe) nach

Differenzierung der Gewebeschnitte mit Elektrolyt-
lösung (z.B. MgCl_2) nicht entfärbt . Daraus kann ge-
schlossen werden, daß die Bindung des Farbstoffkations
an das biologische Substrat nicht allein durch Coulomb-
wechselwirkung, sondern auch durch Wasserstoffbrücken-
bindung erfolgt.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 a) M. Phillips and B. Cohen, Stain Technol.,
 2, 74 (1927)
 b) Swan and Felton, "Heterocyclic Compounds +
 Cond.", Interscience Publishers LTD, London
 1957, Kap, 11
- 2 Z. Nemes, R. Dietz, J.B. Lueth, S. Gomba and
 E. Hackenthal, Experienta, 35, 1475 (1979)
- 3 a) J. Pauluhn und H.W. Zimmermann, Ber. Bunsen-
 ges. Phys. Chem., 82, 1265 (1978)
 b) J. Pauluhn und H.W. Zimmermann, Ber. Bunsen-
 ges. Phys. Chem., 83, 76 (1979)
 c) J. Pauluhn, R. Grezes und H.W. Zimmermann,
 Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 83, 708 (1979)
 d) private Mitteilung,
 J. Pauluhn, R. Grezes und H.W. Zimmermann
- 4 Einen allgemeinen Überblick über die Problematik
 der Färbung gibt: H. Harms, "Handbuch der Farb-
 stoffe für die Mikroskopie", Staufien Verlag,
 Leverkusen 1974
- 5 J.M. Hollas, "Die Symmetrie von Molekülen",
 Walter de Gruyter, Berlin/New York 1975
- 6 G.Eber, F. Gruneis, S. Schneider und F. Dörr,
 Chem. Phys. Letters, 29, 397 (1974)
- 7 H.A. Staab, "Einführung in die theoretische
 organische Chemie", Verlag Chemie, Weinheim 1970
- 8 A. Jablonski, Nature, 131, 839 (1933)
- 9 Eine Übersicht über die Spektroskopie mit
 polarisiertem Licht gibt: F. Dörr, Angew. Chem.,
 78, 457 (1966)
- 10 F. Perrin, Ann. Physique, 12, 169 (1929)
- 11 P.P. Feophilov, "The Physical Basis of Polarized
 Emission", Consultants Bureau, New York 1961
- 12 J.A. Pople, D.L. Beveridge, "Approximate Molecular
 Orbital Theory", Mc Graw Hill, New York 1970

- 13 K. Schulten, I. Ohmine and M. Karplus, J. Chem. Phys., 64, 4422 (1976)
- 14 K. Ohno, Theor. Chim. Acta, 2, 219 (1964)
- 15 a) M.J.S. Dewar and C. de Llano, J. Am. Chem. Soc., 91, 789 (1969)
 b) M.J.S. Dewar and T. Morita, J. Am. Chem. Soc., 91, 796 (1969)
 c) B. Roos, P.N. Skancke, Act. Chem. Scand., 21, 233 (1967)
- 16 J. Koutecký, J. Chem. Phys., 47, 1501 (1967)
- 17 J. Michl, E.W. Thulstrup and J.H. Eggers, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 78, 575 (1974)
- 18 a) P. Tavan and K. Schulten, J. Chem. Phys., 70, 5407 (1979)
 b) P. Tavan and K. Schulten, J. Chem. Phys., 70, 5414 (1979)
- 19 R. Pariser, J. Chem. Phys., 24, 250 (1956)
- 20 Aufgrund der Ähnlichkeit der untersuchten Moleküle sei hier auch auf die Arbeit von W. Seiffert, V. Zanker, H. Mantsch und B. Schneider, Tetrahedron Lett., 54, 5655 (1968) , über Aminoacridine verwiesen.
- 21 K. Schulten and M. Karplus, Chem. Phys. Letters, 14, 305 (1972)
- 22 J.R. Platt, J. Chem. Phys., 17, 484 (1949)
- 23 E. Clar, "Polycyclic Hydrocarbons", Springer/ Berlin 1964
- 24 I. Ohmine, M. Karplus and K. Schulten, J. Chem. Phys., 68, 2298 (1978)
- 25 P. Tavan and K. Schulten, Chem. Phys. Letters, 56, 200 (1978)
- 26 K. Dimroth, C. Reichardt, T. Siepmann und F. Bohlmann, Liebigs Ann. Chem., 661, 1 (1963)
- 27 N. Mikami, J. Mol. Spectrosc., 37, 147 (1971)
- 28 R.P. Steiner and J. Michl, J. Am. Chem. Soc., 100, 6861 (1978)

- 29 C. Reichardt, "Solvent Effects in Organic Chemistry",
Verlag Chemie, Weinheim/New York 1979
- 30 Jaffé and Orchin, "Theory and Applications of
Ultraviolet Spectroscopy", Wiley, New York 1962
- 31 H.H. Perkamus und T. Rössel, Z. Elektrochem., Ber.
Bunsenges. Phys. Chem., 60, 1102 (1956)
- 32 H.H. Perkamus und T. Rössel, Z. Elektrochem., Ber.
Bunsenges. Phys. Chem., 62, 94 (1958)
- 33 J. Eggers, R. Posse und G. Scheibe, Z. Elektro-
chem., Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 58, 731 (1954)
- 34 H. Zimmermann, Diplomarbeit, Freiburg 1974
- 35 a) I.W. Baker and L.G. Groves, J. Chem. Soc. (London),
1144 (1939)
b) C.W.N. Cumper, A.I. Vogel and S. Walker,
J. Chem. Soc. (London), 3640 (1957)
c) W.C. Price, Chem. Rev., 41, 257 (1947)
- 36 V. Zanker, Z. Phys. Chem. (N.F.), 2, 52 (1954)
- 37 V. Zanker und G. Schiefele, Z. Elektrochem., Ber.
Bunsenges. Phys. Chem., 62, 86 (1958)
- 38 H.H. Limbach, W. Seiffert, E. Ohmes und H. Zimmer-
mann, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 74, 966 (1970)
- 39 a) W. Seiffert, H.H. Limbach, V. Zanker und
H. Mantsch, Histochemie, 23, 220 (1970)
b) G. Scheibe, W. Seiffert, G. Hohlneicher, C.
Jutz und H.J. Springer, Tetrahedron Lett.,
41, 5053 (1966)
- 40 T. Clerc, E. Pretsch, "Kernresonanzspektroskopie",
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. Main
1970
- 41 H.H. Perkamus und U. Krüger, Ber. Bunsenges.
Phys. Chem., 71, 447 (1967)
- 42 H. Leonhardt, "Histologie, Zytologie und Mikro-
anatomie des Menschen," Georg Thieme Verlag,
Stuttgart 1974

- 43 a) private Mitteilung,
U. Zimmermann, Freie Universität Berlin
- b) siehe Literaturzitat Nr. 4
- 44 H.C. Burck, "Histologische Technik", Georg Thieme
Verlag, Stuttgart 1973, 3. Auflage
- 45 B. Romeis, "Mikroskopische Technik, Oldenbourg
Verlag, München 1968, 16. Auflage
- 46 a) P. Bartels, Z. Phys. Chem. (N.F.), 9, 95 (1956)
b) S. Gantert, Diplomarbeit, Freiburg 1977
c) H. Ruprecht, Diplomarbeit, Freiburg 1977
- 47 a) I.C. Smith, N. Graham and B. Chance,
Rev. Sci. Instrum., 49, 1491 (1978)
b) J. Dehler und F. Dörr, Z. Angew. Phys.,
19, 147 (1965)
c) Dirk Bergmann, Dissertation, Freiburg 1976
- 48 A. Wohl und W. Aue, Chem. Ber., 34, 2442 (1901)
Siehe auch Literaturzitat Nr. 34
- 49 S. Maffei and G.F. Bettinetti, Ann. Chim.(Rome),
45, 1031 (1955)
- 50 T. Hirashima and O. Manabe, Chem. Letters,
259 (1975)
- 51 J.I.G. Cadogan, Synthesis, 1, 11 (1969)
- 52 F. Ullmann und F. Mauthner, Chem. Ber., 35, 4302
(1902)
- 53 Swan and Felton, "Heterocyclic Compounds +
Cond.", Interscience Publishers LTD, London 1957,
Kap. 1 + 6.
- 54 L. Horner und H. Lang, Chem. Ber., 89, 2768 (1956)
- 55 G. Gaertner, A. Gray and F.G. Hollimann, Tetrahedron,
18, 1105 (1962)
- 56 R. Nietzki und O. Ernst, Chem. Ber., 23, 1852 (1890)
- 57 A. Lange, Diplomarbeit, Freiburg 1976
- 58 O.N. Witt, Chem. Ber., 12, 933 (1879)
- 59 I. Fernando, W.S. Morgan and I.W. Haussner,
J. Org. Chem., 32, 1120 (1967)

- 60 private Mitteilung,
P. Plieninger, Freie Universität Berlin
- 61 F.G. Hollimann, R.A.W. Johnstone, B.J. Millard,
J. Chem. Soc.C, 2351 (1967)
- 62 a) E. Fischer und F. Passmore, Chem. Ber.,
22, 355 (1889): Schmp.: 265⁰C
b) O.N. Nechaeva and Z.V. Pushkareva, Zhur.
Obshchei Khim., 28, 2693 (1958): Schmp.: 287⁰C
c) F. Ullmann, Liebigs Ann. Chem., 366, 91
(1909): Schmp.: 290-291⁰C
d) siehe auch Literaturzitat Nr. 53
- 63 Shell Internationale Research Maatschappij N.V.
Neth. Appl. 6,511,395, March 4, (durch Chem.
Abstracts, 65,2279 h (1966))
- 64 A.V. Strakhov and Z.V. Pushkareva, Trudy Ural.
Polytekh. Inst. im. S. M. Kirova, 94, 34 (1960),
(durch Chem. Abstracts, 55, 27355 c (1961))

LEBENS LAUF

Name: Alfred Heinrich Lange
Geburtsdatum: 23 Februar 1950
Geburtsort: Offenburg/Baden
Eltern: Willi Lange, Elektrotechniker
Hilde Lange geb. Schmitt

Zeitlicher Verlauf der Ausbildung

1956 - 1960	Besuch der Volksschule in Offenburg
1960 - 1969	Besuch des Schiller-Gymnasiums in Offenburg
Oktober/November 1969	Grundwehrdienst bei der Bundes- wehr
November 1969 - März 1971	Ersatzdienst in Görwihl und Freiburg
April 1971	Beginn des Studiums der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg im Breisgau
April 1973	Diplomchemiker-Vorprüfung
Oktober 1975 - Mai 1976	Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. H. Baumgärtel
4 Juni 1976	Diplomchemiker-Hauptprüfung
September 1976 März 1977	Doktorarbeit am Institut für Physikalische Chemie 1 der Uni- versität Freiburg im Breisgau unter Leitung von Prof. Dr. H. Baumgärtel, und wissenschaftlicher Mitarbeiter
April 1977 - Mai 1980	Weiterführung der Doktorarbeit am Institut für Physikalische Chemie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Prof. Dr. H. Baumgärtel, und wissenschaftlicher Assistent

